



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

CUANTIFICACION DE LOS NIVELES  
PLASMATICOS DE ISONIACIDA EN  
SUJETOS SANOS VOLUNTARIOS

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
REFUGIO ROMERO CUELLAR

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1989



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	Pág.
1. INTRODUCCION . . . . .	1
1.1. Generalidades de Isoniacida	
1.1.1. Nombre y fórmula . . . . .	2
1.1.2. Propiedades fisicoquímicas . . . . .	3
1.1.3. Estabilidad . . . . .	3
1.1.4. Mecanismo de Acción . . . . .	5
1.1.5. Características farmacocinéticas . . . . .	5
1.1.6. Tratamiento . . . . .	8
1.1.7. Efectos Indeseables . . . . .	12
1.1.8. Aplicaciones terapéuticas . . . . .	13
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA . . . . .	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA . . . . .	19
4. OBJETIVOS . . . . .	21
5. HIPOTESIS . . . . .	22
6. PARTE EXPERIMENTAL	
6.1. Material, reactivos, soluciones y equipo . . . . .	23
6.2. Procedimiento . . . . .	25
6.2.1. Estandarización del método . . . . .	25
6.2.2. Validación del método analítico . . . . .	26
6.2.2.1 Exactitud, precisión y linealidad . . . . .	26
6.2.2.2 Precisión Inter-día . . . . .	26

6.2.2.3	Mínima concentración detectable . . . . .	26
6.2.2.4	Porcentaje de recuperación . . . . .	27
6.3.	Protocolo experimental . . . . .	27
7.	RESULTADOS	
7.1.	Validación del método analítico . . . . .	29
7.1.1	Linealidad de las curvas estándar en agua y plasma . . . . .	29
7.1.2	Porcentaje de recuperación . . . . .	33
7.1.3	Exactitud . . . . .	33
7.1.4	Precisión Intra e Inter-día . . . . .	37
7.1.5	Linealidad del método . . . . .	37
7.1.6	Mínima concentración detectable . . . . .	39
7.2.	Estudio de los niveles plasmáticos de Isoniacida después de la administración oral de una solución en sujetos sanos voluntarios . . . . .	39
8.	ANALISIS DE RESULTADOS	
8.1.	Validación del método analítico . . . . .	53
8.2.	Niveles plasmáticos de isoniacida después de la administración oral de una solución en sujetos sanos voluntarios . . . . .	55
9.	CONCLUSIONES . . . . .	58
10.	RECOMENDACIONES . . . . .	60

11.	APENDICE I	61
12.	APENDICE II	63
13.	BIBLIOGRAFIA	64

## 1. INTRODUCCION

El propósito de este trabajo es contribuir al establecimiento de bases en la terapia antituberculosa, que nos permitan optimizar el régimen de dosificación de corta duración empleado actualmente en el país, para el tratamiento de dicha enfermedad.

Actualmente la isoniacida se considera el fármaco de elección para la terapia antituberculosa, se emplea concomitantemente con otros fármacos como la rifampicina, estreptomicina, etambutol y pirazinamida, para evitar que se pueda generar resistencia microbiana.

La isoniacida se incluye en todos los regimenes de dosificación, debido a que es la más barata y potente.

La primera fase necesaria en este proyecto fue la de seleccionar y validar un método analítico confiable, de preferencia sencillo y de bajo costo que permitiera cuantificar la isoniacida de manera confiable en plasma de sujetos sanos voluntarios, así como la de determinar que características metabólicas presentan, ya que la biotransformación de la isoniacida esta determinada genéticamente, y esto puede influir en la respuesta terapéutica.

### 1.1. Generalidades de Isoniacida.

La síntesis de la isoniacida fue reportada en 1921 por Meyer y Mally, pero no fue hasta los años 1950's que tres grupos de investigadores, en forma independiente y simultánea descubrieron su marcada actividad antituberculosa. (1).

#### 1.1.1. Nombre y fórmula.

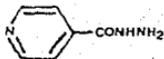
Su nombre genérico es: isoniacida, Hidracina del ácido isonicotínico; INH, Isonicotinilhidrazina, Isonicotinoilhidrazina, Tubazid. (2,3).

Nombre químico: 4-Piridin hidracina del ácido carboxílico, Piridin-4-carboxil hidrazina, Piridin-hidrazina del ácido carboxílico.

Fórmula condensada:



Fórmula desarrollada:



### 1.1.2. Propiedades fisicoquímicas.

Cristales incoloros, inodoros o polvo cristalino, con un sabor ligeramente dulce primero y amargo después, tiene un punto de fusión de 172°C. (3).

Solubilidad en agua: 4 g de isoniácida son solubles en 100 ml de agua a 25°C, 26 g son solubles en 100 ml de agua a 40°C. (2).

#### Solubilidad en solventes.

Solvente	Solubilidad
Etanol (25°C)	2 g/100 ml
Etanol (hirviendo)	10 g/100 ml
Cloroformo	0.1 g/100 ml
Etil eter	muy ligeramente soluble
Benceno	insoluble
pH; de una solución (1 en 10) es de 6 - 7.5	
PKa = 3.6	
Constante de disociación $3 \times 10^{-11}$ .	

### 1.1.3. Estabilidad

La isoniácida es estable por varias semanas en solución amortiguadora a pH = 8. Hald establece que la iso

niacida sufre una oxidación lenta en solución acuosa, pero en presencia de sacarosa, la isoniacida reacciona con la aldohexosa formada por inversión. La reacción con la sacarosa puede ser inhibida por la adición de 0.2 % de citrato de sodio.

Poole y Meyer, reportan que la isoniacida es inestable en plasma. La inestabilidad en plasma se puede retardar conservando las muestras a 5°C. (3).

En cuanto a la estabilidad de la isoniacida en suero y orina; una concentración de 10 mcg/ml a 25°C, se degradó casi tres cuartas partes después de unas semanas de almacenamiento. Alrededor del 10 % de isoniacida, se transformó a ácido isonicotínico. La estabilidad fue considerablemente incrementada por medio de una extracción con 1-butanol y después de una semana fue de 65 y 82 % para suero y orina respectivamente de la cantidad inicial. (4).

Se demostró que en la inestabilidad de la isoniacida en orina puede contribuir la contaminación bacteriana, la cual puede ser eliminada por la adición de timol como conservador. (4).

La degradación de isoniacida en suero a partir de una concentración de 10 mcg/ml que se almacenó durante 6 meses a

- 20°C fue de 4 ½ al mes. (4).

Peters (4) concluye que la isoniacida es estable por un período de 56 días, cuando se almacena en congelación a - 18°C.

#### 1.1.4. Mecanismo de acción.

Aunque el mecanismo de acción de la isoniacida es desconocido, hay varias hipótesis: efectos sobre los lípidos, biosíntesis de ácidos nucleicos y glucólisis. Han sugerido que existe una acción primaria de la isoniacida que inhibe la biosíntesis de los ácidos micólicos, importantes constituyentes de la pared celular microbacteriana. Concentraciones pequeñas del fármaco pueden impedir la elongación del ácido graso de cadena muy larga, precursor de la molécula. Como los ácidos micólicos son exclusivos de las micobacterias, esta acción explicaría el alto grado de selectividad de la actividad antimicrobiana de la isoniacida. Solo los bacilos tuberculosos sensibles a la isoniacida captan el fármaco. (5).

#### 1.1.5. Características farmacocinéticas.

La isoniacida se absorbe fácilmente por el trac-

to gastrointestinal. Después de una dosis oral, las concentraciones máximas en sangre se alcanzan entre 0.75 y 2.0 horas (5,6). Se difunde fácilmente en todos los líquidos y células corporales. El fármaco se detecta en cantidades significativas en el líquido cefalorraquídeo aproximadamente el 20 % de las plasmáticas. (2,5).

El volumen de distribución es de 60 % en relación al peso corporal. (7).

No se une a proteínas plasmáticas. (5,7,8).

Después de una dosis intravenosa de 5 mg/kg administrada a 300 sujetos en Finlandia, se mostró claramente una distribución bimodal (4). Esto es debido a que se han reportado 2 tipos de poblaciones, dependiendo de la capacidad de metabolismo; siendo esta una característica, que está relacionada con la actividad de la enzima N-acetiltransferasa del hígado (1). Los inactivadores lentos tienen menos N-acetiltransferasa que los inactivadores rápidos, aunque las propiedades de las enzimas purificadas obtenidas en ambos fenotipos parecen idénticas, es posible que los inactivadores lentos sintetizen la enzima con más lentitud o la degraden más rápidamente que lo normal. (9).

La isoniacida se metaboliza por N-acetilación y en me-

nor proporción por hidrólisis. Los mayores productos de excreción urinaria son: isoniácida intacta, isonicotilhidracina del ác. pirúvico, isonicotinohidrazona del ác. cetoglutarico; acetilisoniacida, ác. isonicotínico, ác. isonicotínico. acetilhidracina y ác. 1,2 diacetilhidracina (1,10, 11). Sin embargo ninguno de estos metabolitos poseen actividad antituberculosa.

Las siguientes cantidades de metabolitos, expresadas en por ciento de la dosis, son excretadas en la orina por acetiladores rápidos y lentos respectivamente, 24 horas después de la administración de una dosis única de 300 mg de isoniácida: 46 %, 28.9 % como acetilisoniacida; 1.8 % como acetilhidracina y 23 %, 4.9 % como diacetilhidracina (12). La eliminación de la isoniácida depende de la velocidad de acetilación, en pacientes con función renal normal, un 50-70 % de una dosis aparece en la orina en 24 horas, principalmente como metabolito (2). Algunos autores reportan un 75-95 % como metabolitos (6), y en forma inalterada, 5-27 % (8).

Después de la administración de una dosis oral de isoniácida a inactivadores lentos, se determinaron las concentraciones plasmáticas, y se obtuvieron: concentración máxima ( $C_{max}$ ) 7.86 - 9.15 mcu/ml; tiempo máximo ( $t_{max}$ ) 0.75 - 1.05 horas; y el área bajo la curva (ABC) 49.9 - 50.6 - -

mcg hr/ml (6). La concentración plasmática promedio de isoniacida en los inactivadores rápidos es de 30 a 50 % con respecto a los lentos (6).

El tiempo de vida media para inactivadores rápidos esta en el intervalo de 40 - 110 min, y para los lentos de 140 - 270 min. (2,7,8,10,13).

Se asume en general un modelo abierto de un compartimiento para la farmacocinética de Isoniacida administrado por vía oral (6,10).

La depuración renal es de 41 ml/min, (8). Esta depende solamente en escaso grado del estado de la función renal, pero los pacientes que son inactivadores lentos pueden presentar toxicidad si su función renal se encuentra alterada (7).

#### 1.1.6. Tratamiento.

Algunos de los tratamientos efectivos de la tuberculosis pulmonar no complicada, consiste en la administración de isoniacida, 5 mg/kg (hasta 500 mg/día) más rifampicina, 600 mg 1 vez por día. También debe incluirse piridoxina, de 15 a 50 mg/día, para la mayoría de los pacientes adultos. El régimen usual para lactantes y niños, es la administración de isoniacida 10 a 20 mg/kg por día (máximo de 300 mg),

más rifampicina 10 mg/kg (máximo de 600 mg). El tratamiento debe continuarse de 9 a 12 meses. Otro régimen efectivo para la tuberculosis pulmonar leve o moderadamente severa, consiste en isoniacida (300 mg/día) más etambutol (15 mg/kg/día) durante 18 a 24 meses. Se ha observado la eficacia de programas terapéuticos de seis meses de duración. Durante los primeros 2 meses incluyen isoniacida, rifampicina, estreptomina y pirazinamida, los siguientes 4 meses, isoniacida y rifampicina (5). El nivel de isoniacida en suero debe ser mínimo de 0.4 mcg/ml a las 6 hrs, siendo esto necesario para obtener una actividad antimicrobiana adecuada.

Ciertos pacientes deben ser tratados con 3 fármacos inicialmente para asegurarse que el microorganismo será sensible por lo menos a 2 de los agentes empleados. El tercer agente puede ser etambutol o la estreptomina (1 g/día). La dosis de estreptomina es reducida a 1 g, 2 veces por semana después de 2 meses (5).

La dosis usual de isoniacida en tuberculosis es de 4-5 mg/kg de peso/día oral, o dosis dividida hasta un máximo de 300 mg al día; dosis de 10 mg/kg de peso diario, puede ser dada durante la primera o segunda semana del tratamiento de la meningitis tuberculosa. Una dosis de 15 mg/kg se emplea 2 veces a la semana en tratamiento intermitente (2).

Se ha sugerido que es posible administrar sin riesgo 300 mg/día de isoniacida en sujetos, basandose en pruebas funcionales renales dadas por la concentración plasmática de creatinina (nivel menor de 120 mcg/ml) (5).

La isoniacida se puede administrar intratecalmente en dosis de 25 a 50 mg diarios para adultos y 10 a 20 mg diarios para niños.

En personas que están en contacto con enfermos tuberculosos, en las que existe evidencia comprobada de infección aún siendo asintomática y aquellas que presentan antecedentes de tuberculosis, se recomienda como profilaxis, administrar una dosis de 300 mg de isoniacida diaria por un año (2, 14).

Los tratamientos antituberculosos en México, recomendados por la Secretaría de Salud (15), son:

Tratamiento primario autoadministrado (12 meses):

- Fase intensiva: 60 dosis (2 meses) isoniacida 300 mg  
etambutol 1200 mg, estreptomycinina -  
1 g (diaria).
- Fase sostén: 300 dosis (10 meses).  
isoniacida 300 mg, etambutol 1200 mg.

Tratamiento primario de corta duración, supervisado (hasta 7 - meses de duración).

- Fase intensiva: 60 dosis, diario de lunes a sábado - hasta 3 meses.  
Isoniacida 300 mg, rifampicina 600 mg, estreptomycin 1 g, pirazinamida 2 g.
- Fase sostén: 30 dosis intermitentes, 2 veces por semana, hasta 4 meses.  
Isoniacida 800 mg, rifampicina 600 mg.

Un problema que se presenta durante el tratamiento es que puede surgir resistencia rápidamente y es función de la magnitud de la población bacteriana presente en la lesión. La importancia clínica de la resistencia a la isoniacida depende del tipo de enfermedad tuberculosa. Es significativa tal resistencia si hay un gran foco de infección persistente, pero no lo es tanto si la enfermedad es mínima. La adición de un segundo o un tercer antituberculoso retarda el comienzo de la resistencia. En raras ocasiones se observa resistencia cruzada con otros antituberculosos.

La isoniacida es tuberculocida o tuberculostática in vitro, lo cual depende de factores como el número de microorganismos presentes y la concentración del fármaco. La concentración tuberculostática mínima de la isoniacida para casi todas

las cepas, al parecer es de 0.05 mcg/ml. ( 16).

1.1.7. Efectos indeseables.

La isoniacida no es un fármaco muy tóxico, y las reacciones adversas ocurren en alrededor de 5 por ciento de los pacientes, cuando se utilizan las dosis usuales; dicha frecuencia aumenta con dosis mayores, y las reacciones adversas, sobre todo la polineuritis es más frecuente en los pacientes que son inactivadores lentos (mayor concentración sanguínea), que en los inactivadores rápidos.

Las manifestaciones tóxicas afectan el sistema nervioso, gastrointestinal, el hígado, existiendo además fenómenos alérgicos y hemáticos, estos últimos probablemente por sensibilización.

1. Los trastornos nerviosos son los principales y corresponden a una polineuritis periférica caracterizada por parestesias y debilidad muscular. Puede presentarse inquietud, insomnio, cefalea, temblores, hiperreflexia y también convulsiones tonicoclónicas en pacientes con antecedentes epilépticos; se han observado verdaderas psicosis en sujetos con antecedentes de enfermedades mentales.
2. Las manifestaciones gastrointestinales consisten en anorexia, náuseas y constipación.

3. Los trastornos hepáticos consisten en: hepatitis con ictericia y aumento del nivel de transaminasas en el suero sanguíneo. Al parecer la hepatotoxicidad es más frecuente en los acetiladores rápidos, probablemente debido a la formación de acetilhidracina a partir de la acetilisoniazida.
4. Los fenómenos alérgicos consisten en fiebre, dermatitis y accesos asmáticos.
5. Los trastornos hemáticos, raros y de probablemente origen alérgico, son la púrpura, a veces hemorrágica (hematuria, hemoptisis, hemorragia rectal), leucopenia, eosinofilia y aún agranulocitosis.

La isoniacida debe utilizarse con mucho cuidado en los pacientes con antecedentes epilépticos, que han de ser sometidos a un tratamiento con fármacos anticonvulsivantes, mientras están recibiendo el fármaco; en la misma forma, la isoniacida debe emplearse con cuidado en los sujetos que han padecido alguna enfermedad mental, y así mismo, en los pacientes con trastornos hepáticos. (14,17).

#### 1.1.5. Aplicaciones terapéuticas.

La isoniacida es el principal fármaco utilizado para el tratamiento primario de la tuberculosis pulmonar, en con

junción con otros agentes como etambutol, rifampicina, aminosa  
licilato de sodio o estreptomina. Es útil para la profila-  
xis de la tuberculosis. La isoniacida parece ser la más efec-  
tiva en el tratamiento de lesiones extrapulmonares, incluyendo  
meningitis y enfermedades genitourinarias. Piridoxina 50 a -  
100 mg al día, es dada en conjunción con isoniacida para evi-  
tar neurotoxicidad. (2).

## 2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Un alto porcentaje de muertes ocurridas en México en las últimas décadas, es debido a enfermedades infecciosas y parasitarias. (15).

La tuberculosis es un padecimiento infeccioso producido generalmente por *Mycobacterium Tuberculosis*, que se presenta especialmente en países subdesarrollados, se considera que es responsable de 3 millones de muertes y de la aparición de 4 a 5 millones de casos bacilíferos nuevos cada año, dos de cada 3 enfermos fallecen en menos de 2 años. (15).

La tuberculosis es un importante problema de salud pública en México, debido a la escases de servicios sanitarioasistenciales y bajos niveles generales de vida, lo cual no permite que haya un avance hacia la erradicación total del problema - aún a pesar de las campañas de medicina preventiva realizadas por las diferentes instituciones de salud. (15).

Resulta de gran interés revisar la evolución que ha tenido en México la mortalidad causada por tuberculosis. En el período de 1975-1982, disminuyó de 16.3 a 8.9 por 100 mil habitantes, con un decremento de 95.4 % en 10 años y un promedio anual de 4.5 %. En 1982 fallecieron 6524 personas de tuberculosis, de las cuales 925 eran menores de 15 años, el número de muertes representa 1.6 % del total de las defunciones re-

gistradas en el país, por lo que la tuberculosis ocupó el - - cuarto lugar entre todas las causas de muerte (15); en 1983 representó el 1.5 % del total de muertes y ocupó el décimo - cuarto lugar como causa de defunción, con una tasa de 9.3 por 100 mil habitantes. En ese mismo año, las tasas de defunciones por tuberculosis (por 100 mil) se debieron a las siguientes localizaciones: aparato respiratorio 8.15 %; meninges y sistema nervioso central 0.44; miliar 0.48; intestinal, genitourinaria, de otros órganos y ósea 0.23 %. (18).

Las entidades federativas con mayor tasa de mortalidad en 1983 fueron: Baja California Norte, Veracruz, Chihuahua, Coahuila y Chiapas. (15).

Las instituciones del sector, la Secretaría de Salud, - el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para trabajadores del Estado (ISSSTE), notificaron en 1985, 18,027 (15) y en 1986, - - 16,431 (18) casos de tuberculosis de todas las localizaciones.

Se calcula que en los próximos diez años, si no se llevan a cabo los métodos de control de la tuberculosis, 40 a 10 millones de individuos contraerán la enfermedad, de los cuales dos tercios morirán y en los países subdesarrollados varios millones de niños contraerán el padecimiento y decenas - de miles fallecerán por meningitis tuberculosa. (15).

En el caso de la terapia antituberculosa, debido a la complejidad de los regímenes de dosificación es de vital importancia que en cada país se lleve a cabo una revisión muy amplia para determinar que tan eficaces son éstos y tener un mejor control en cuanto a la toxicidad y eficacia que pueda presentarse.

En publicaciones de la OPS, III Seminario Regional sobre tuberculosis (19), se menciona que se dispone de diversos regímenes de tratamiento de corta duración, y corresponde a las autoridades de salud del país, la selección de los esquemas más adecuados teniendo en cuenta el costo, la disponibilidad de recursos financieros, la eficacia y la toxicidad aceptables. En México, el Instituto de Enfermedades Respiratorias ha determinado cual de entre los diferentes regímenes probados, es el más eficaz y menos tóxico, sin embargo, nos llama la atención que no se considere la diferencia genética metabólica en cuanto al manejo de la isoniacida, que es un fármaco de primera elección en el tratamiento antituberculoso. Aunque este medicamento es en general bien tolerado, puede causar efectos adversos, cuya frecuencia varía dependiendo de los fenotipos, así como de las asociaciones con otros medicamentos de un país a otro.

De acuerdo a lo anterior se puede prevenir y limitar al máximo los efectos adversos mediante la elección de una poso-

logía adecuada y el control sistemático antes de iniciar el -  
tratamiento.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunos de los diferentes métodos reportados para cuantificar isoniacida en fluidos biológicos son espectrofotométricos (4,20,21), fluorométricos (4,22) y por cromatografía de líquidos de alta resolución. (23).

En la actualidad el espectrofotómetro forma parte del equipo general de la mayoría de los laboratorios, por lo cual es deseable un método espectrofotométrico para su uso rutinario en la determinación de los niveles plasmáticos de isoniacida.

Para la cuantificación rutinaria de los niveles plasmáticos se requiere de métodos analíticos sencillos, sensibles y de preferencia de bajo costo, que sean suficientemente confiables para los fines propuestos del estudio.

De aquí la importancia de llevar a cabo la validación del método espectrofotométrico que se utilizará posteriormente a la clasificación de los diferentes grupos de acetiladores que se pueden encontrar en una población.

Es importante la clasificación del patrón metabólico de la isoniacida en cuanto a la velocidad de acetilación ya que por una parte es el fármaco de elección en el tratamiento de

la tuberculosis y por otra se tienen reportes de que los inac  
tivadores lentos tienden a presentar niveles plasmáticos más  
prolongados después de la administración de una dosis están  
dar en comparación con los inactivadores rápidos, debido a es  
to presentan diversas reacciones adversas entre las que se en  
cuentran hepatitis y neuritis periférica. (14, 17).

4. OBJETIVOS

1. Seguir los niveles plasmáticos de isoniacida en sujetos sanos voluntarios, en una población pequeña, que nos permita obtener un conocimiento básico de la variabilidad individual (tipo de acetilador).
2. Validar un método espectrofotométrico que permita, análisis confiables de isoniacida en muestras plasmáticas.
3. Contribuir con una muestra a la caracterización genética de acetilación en la población mexicana.

## 5. HIPOTESIS

De acuerdo a las características genéticas, existen 2 tipos de poblaciones para la acetilación de isoniacida: acetiladores lentos y rápidos. Una propiedad farmacocinética que nos ayuda a determinar el tipo de acetilador en el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ). Si el  $t_{1/2}$  de los sujetos que participen en el estudio se encuentra entre: 40 - 110 min, se clasificarán como acetiladores rápidos y de 140 - 240 min. como acetiladores lentos. (2,7,8,10,13)

Debido a que hay variaciones en el curso temporal de las concentraciones plasmáticas de isoniacida en los dos tipos de acetiladores, las áreas bajo la curva serán diferentes y probablemente mayores para los acetiladores lentos.

Debido a que la isoniacida se absorbe rápidamente se espera encontrar los  $t_{max}$  en el siguiente intervalo reportado 0.75 - 2.0 hrs. (5,6)

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. Material, reactivos, soluciones y equipo.

#### - Material.

Pipetas volumétricas 1, 5, 10 ml.

Matraz volumétrico 10, 50, 100 ml.

Tubo de ensaye 16 x 100 mm.

Gradilla para tubos de ensayo.

Vasos de precipitados 10, 50, 100 ml.

Pipetas graduadas 5 ml.

Celdas para espectrofotómetro.

Probeta 100 ml.

#### - Reactivos.

Metil isobutil cetona R.A. Baker.

Acido 2,4,6 trinitrobencensulfónico (sintetizado en:

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.).

ver anexo.

Acido cítrico R.A. Baker.

Dextrosa R.A. Baker.

Citrato de sodio. Merck.

Fosfato de potasio dibásico R.A. Baker.

Isoniacida (materia prima). Squibb.

- Soluciones.

Solución patrón de isoniacida 1 mg/ml en agua destilada.

Solución 1.95 M de Fosfato de potasio dibásico.

Solución de ác. 2,4,6 trinitrobencensulfónico 250 mg/50 ml de agua destilada.

Solución dextrosa citrato (0.8 g de ác. cítrico, 2.2 g citrato de sodio, 2.4 g glucosa en 100 ml de agua).

- Equipo.

Balanza analítica Sartorius.

Vortex Mixer.

Cronómetro Haste Sport 7 Jewels.

Centrífuga IEC Clinical Damon.

Roto torque Cole Parmer Modelo 7637.

Espectrofotómetro Varian DMS 90.

Microcomputadora HP 85, Modelo 91300.

## 6.2. Procedimiento.

### Estandarización del método.

Fue utilizado el método reportado por Dymond (24). Que consiste en la reacción entre el grupo amino de la isoniacida y el ácido 2,4,6 trinitrobenzensulfónico. El complejo colorido se extrae con metil isobutil cetona y éste presenta una absorbancia máxima a una longitud de onda de 500 nm.

### 6.2.1. Método Analítico para Cuantificar Isoniacida.

A 1 ml de muestra (plasma, solución acuosa de isoniacida), se le agregó 5 ml de solución de fosfato y se agitó 5 seg en vortex, a esta mezcla se le adicionó 1.5 ml de ácido 2,4,6 trinitrobenzensulfónico y nuevamente se agitó en vortex durante 5 seg, se añadió 4 ml de metil isobutil cetona; se dejó reposar 15 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se agitó 30 min en el roto torque y se centrifugó 5 min a 1500 rpm, separando la fase orgánica y determinando su absorbancia a 500 nm.

### Soluciones estándar de isoniacida

En un matraz volumétrico de 100 ml se colocaron 100 mg de isoniacida, se diluyó con agua destilada hasta el aforo; a

partir de esta solución de 1 mg/ml, se hicieron diluciones adecuadas para obtener las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 y 20.0 mcg/ml, tanto en agua como plasma.

#### 6.2.2. Validación del Método Analítico.

##### 6.2.2.1. Exactitud, precisión y linealidad.

Con el fin de evaluar los parámetros de la validación como son: exactitud, precisión y linealidad, se analizaron por quintuplicado muestras en agua y plasma conteniendo 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0 y 20.0 mcg/ml de isoniacida.

##### 6.2.2. Precisión Inter-días.

Con la finalidad de conocer la variación de la determinación espectrofotométrica de isoniacida en solución acuosa y en plasma en condiciones idénticas de operador, aparato, laboratorio, pero en diferentes ocasiones, se hicieron determinaciones conocidas en diferentes días según se muestran en la tabla IV.

##### 6.2.2. Mínima concentración detectable.

Con el objeto de conocer la mínima concentra-

ción que es posible detectar en agua y plasma, se procedió a determinar muestras de concentraciones de 0.4, 0.3, 0.2 mcg/ml, por quintuplicado.

#### 6.2.2.2. Porcentaje de recuperación.

Se obtendrá a partir de la comparación de las mismas concentraciones de isoniacida en agua y plasma.

#### 6.3. Protocolo Experimental.

1. Participaron en el estudio, 7 sujetos sanos voluntarios, ambos sexos, con edad entre 25-35 años y peso corporal de 50-75 kg.
2. 15 días antes y durante el estudio, no ingirieron otro medicamento.
3. Los participantes se mantuvieron en ayunas un mínimo de 10 horas, antes de la administración del fármaco y se les permitió ingerir el mismo tipo de alimento después de 4 horas post-administración.
4. Cada sujeto recibió una dosis oral de 500 mg de isoniacida en polvo, disuelta previamente en 50 ml de agua.

5. Antes de la administración del fármaco se tomó una muestra de 10 ml de sangre. Posteriormente se colectaron muestras sanguíneas de 5 ml en tubos que contenían 0.83 ml de solución dextrosa-citrato, a los siguientes tiempos: 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 45.0, 60.0, 120.0, 150.0, 180.0, 240.0, 300.0, 330.0, 360.0 min., después de la administración, las muestras fueron centrifugadas, separándose el plasma y analizándose inmediatamente. Por el método analítico descrito en la sección 6.2.1.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Validación del método analítico.

Los resultados obtenidos al seguir los procedimientos explicados en la validación del método analítico, se presentan a continuación:

#### 7.1.1. Linealidad de las curvas estándar en agua y plasma.

En la tabla I, se muestran resultados de las absorbancias para las concentraciones comprendidas entre 0.5 - 20.0 mcg/ml de isoniacida en agua, así como el coeficiente de variación en por ciento (2.16 - 5.4). Mediante un análisis de regresión promedio, se obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente (m) de 0.03619, intercepto (b) de 0.00638 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9998  $n = 5$ .

Al graficar los valores de las concentraciones contra el promedio de las absorbancias, se obtiene una relación lineal como se muestra en la gráfica No. 1, las correspondientes desviaciones estándar para esta curva, se encuentran en el intervalo de 0.0005 - 0.009.

En la tabla II, se obtuvieron los coeficientes de variación en por ciento (1.29 - 15.38) para el intervalo de

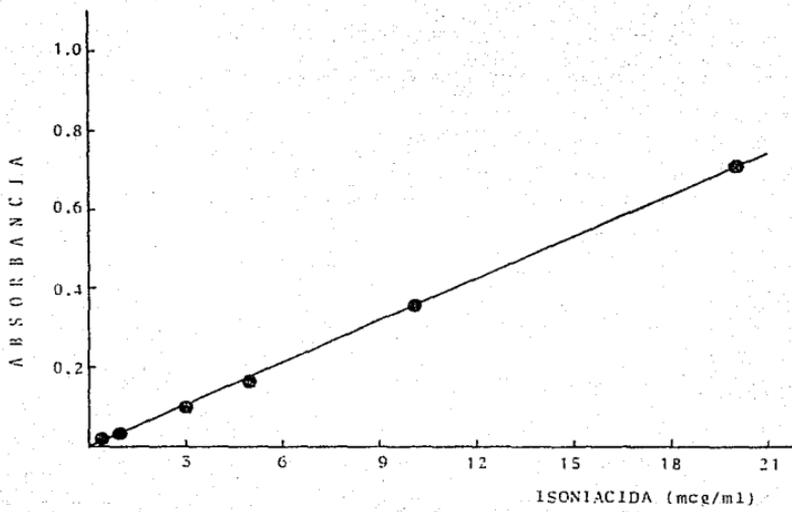
Tabla 1. Determinación de Isoniacida en agua

Conc. mcg/ml	A b s o r b a n c i a						S	C.V. (%)
						$\bar{X}$		
0.5	0.018	0.017	0.018	0.017	0.018	0.0176	0.00054	3.1
1.0	0.029	0.028	0.031	0.032	0.031	0.0302	0.0016	5.4
3.0	0.102	0.094	0.095	0.101	0.107	0.0998	0.0053	5.3
5.0	0.162	0.164	0.184	0.164	0.166	0.169	0.0087	5.19
10.0	0.347	0.370	0.360	0.351	0.351	0.355	0.0092	2.16
20.0	0.721	0.711	0.720	0.700	0.743	0.719	0.0015	2.2

Ecuación de Regresión

$$y = 0.03619 X + 0.00638$$

$$r = 0.999$$



GRAFICA 1. Calibración de Isoniacida en agua.

Tabla II. Determinación de Isoniacida en plasma

Conc. mcg/ml	A b s o r b a n c i a						S	C.V. (%)
	$\bar{X}$							
0.5	0.014	0.012	0.016	0.012	0.011	0.0130	0.002	15.38
1.0	0.031	0.03	0.03	0.031	0.03	0.0304	0.0054	1.18
3.0	0.101	0.106	0.108	0.109	0.112	0.1072	0.0040	3.81
5.0	0.169	0.163	0.162	0.174	0.174	0.1684	0.0057	3.4
10.0	0.346	0.346	0.35	0.356	0.354	0.3504	0.0045	1.3
20.0	0.718	0.712	0.704	0.694	0.703	0.7062	0.0097	1.29

Ecuación de Regresión.

$$y = 0.0355 X + 0.0045$$

$$r = 0.999$$

concentraciones entre 0.5 - 20.0 mcg/ml de isoniacida en plasma. Mediante un análisis de regresión promedio de absorbancia, se obtuvo la ecuación de una línea recta con pendiente (m) de 0.0355, intercepto (b) de 0.0045 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.999  $n = 5$ .

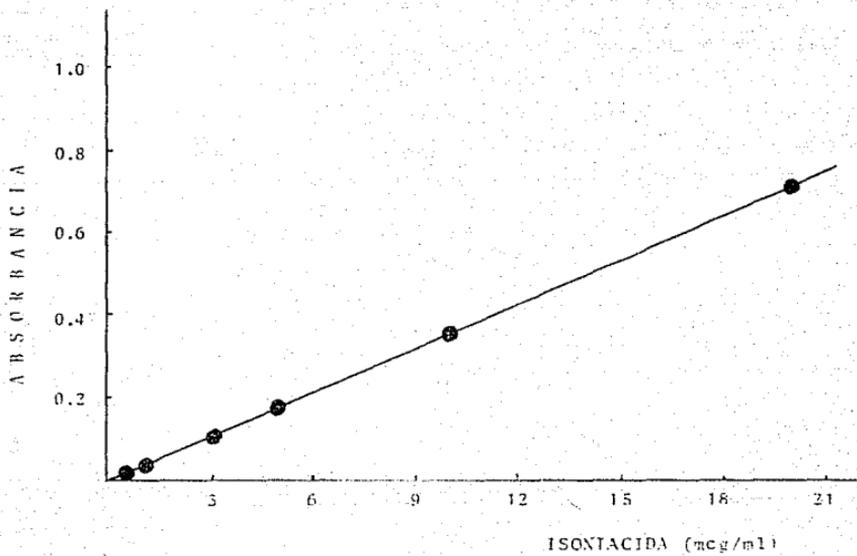
En la gráfica No. 2, se muestra una relación lineal entre los valores de las concentraciones y el promedio de las absorbancias.

#### 7.1.2. Porcentaje de recuperación.

La tabla III muestra el porcentaje de recuperación de isoniacida en plasma; que fue de 101.50 % en promedio para con  $n = 30$ .

#### 7.1.3. Exactitud.

La propiedad del método de proporcionar resultados - - cuantitativos lo más cercanos al valor real se demostró estadísticamente, considerando los datos del porcentaje recuperado en promedio ( $101.50 \pm 6.0$ ), se determinó el intervalo de confianza al  $t_{95}$  % ( $99.0 - 103.5$ ), para  $n = 30$ .



GRAFICA 2. Calibración de Isoniacida en plasma.

Tabla III. Porcentaje de recuperación de Isoniacida en plasma

mcg/ml adicionados de Isoniacida	mcg/ml recuperados de Isoniacida	porcentaje de recuperación
0.5	0.56	113.06
0.5	0.51	102.01
0.5	0.62	124.12
0.5	0.51	102.01
0.5	0.48	96.48
1.0	1.03	103.51
1.0	1.00	100.75
1.0	1.00	100.75
1.0	1.03	103.51
1.0	1.00	100.75
3.0	2.97	98.98
3.0	3.10	103.59
3.0	3.16	105.43
3.0	3.19	106.36
3.0	3.27	109.12
5.0	4.85	96.98
5.0	4.68	93.66
5.0	4.66	93.11
5.0	4.99	99.74
5.0	4.99	99.74
10.0	9.74	97.40
10.0	9.74	97.40
10.0	9.85	98.51
10.0	10.02	100.17
10.0	9.96	99.61
20.0	20.02	100.10
20.0	19.85	99.27
20.0	19.63	98.17
20.0	19.36	98.79
20.0	19.60	98.03

$\bar{X}$  = 101.30

S = 6.0

#### 7.1.4. Precisión (intra-días)

Se determinó empleando  $n = 5$ , para cada una de las concentraciones (0.5 a 20 mcg/ml), el mismo día y el mismo analista, se analizaron estadísticamente empleando una prueba de " $J_i^2$ ", y se obtuvo el intervalo de confianza al 97.5 % (4.77 - 7.88).

#### Precisión inter-días.

En la tabla IV, se muestran los datos obtenidos en diferentes días por un mismo analista, calculándose el coeficiente de variación en porcentaje (5.5 - 7.3) para el intervalo de concentraciones de 1.0 - 15.0 mcg/ml de isoniacida en plasma. Se analizaron estadísticamente, empleando " $J_i^2$ " ( $J_i$  cuadrada), y se obtuvo el intervalo de confianza al 97.5 % (8.77 - 57.55).

#### 7.1.5. Linealidad del método.

Para determinar la linealidad del método, se utilizaron los resultados de las concentraciones adicionadas y recuperadas de isoniacida (tabla III). Se efectuó el análisis de regresión lineal, calculándose el coeficiente de correlación  $r^2 = 0.9999$ , la pendiente de la recta ( $m$ ) = 0.9814 y el intercepto ( $b$ ) = 0.0545.

Tabla IV. Precisión Inter-día del método de Isoniacida en plasma por un mismo analista en diferentes días.

Conc. mcg/ml	A b s o r b a n c i a					$\bar{X}$	t recuperación	S	C.V. (%)
	1	2	3	4	5				
1	0.047	0.04	0.04	0.04	0.043	0.042	133.91	0.0030	7.3
5	0.206	0.18	0.18	0.175	0.182	0.184	105.27	0.00012	6.6
10	0.370	0.38	0.38	0.34	0.355	0.358	100.72	0.00019	5.5
15		0.555	0.555	0.555			103.44		

Ecuación de Regresión

$$y = 0.0350 X + 0.00747$$

$$r = 0.9996$$

La gráfica 3 muestra la curva obtenida para las concentraciones de 0.5 a 20.0 mcg/ml.

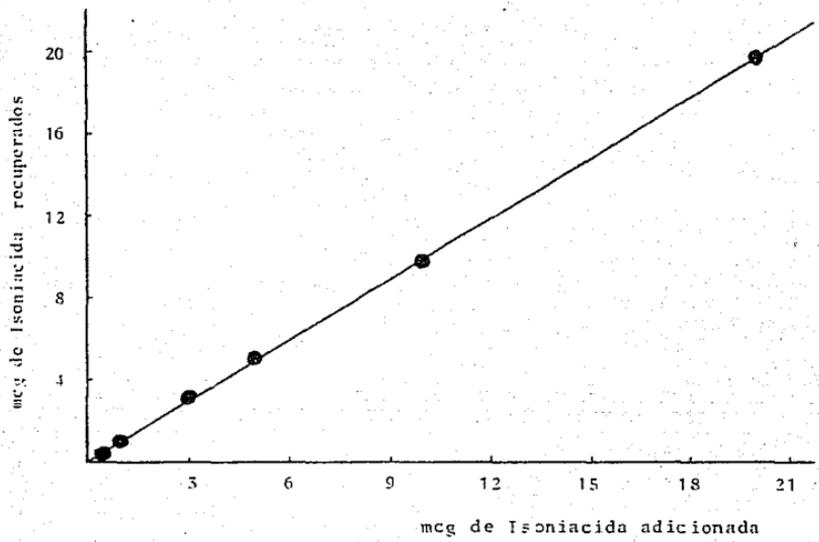
Se analizaron estadísticamente empleando una prueba de "t" obteniendo el intervalo de confianza para el intercepto al 95 % (-0.0285 - 0.1365) y el intervalo de confianza para la pendiente al 95 % (0.9725 - 0.9901), con  $n = 30$ .

#### 7.1.6. Mínima concentración detectable.

En la tabla V, se presentan las absorbancias de las concentraciones de 0.2 - 0.4 mcg/ml de isoniacida en agua, sus coeficientes de variación están entre (11.76 - 22.66) y la desviación estándar (0.001 - 0.002). Para las absorbancias de las concentraciones de 0.3 - 0.4 mcg/ml de isoniacida en plasma se calcularon los coeficientes de variación (42,15 - 50.98) y desviaciones estándar (0.004 - 0.005).

#### 7.2. Estudio de los niveles plasmáticos de Isoniacida después de la administración oral de una solución en sujetos sanos voluntarios.

La tabla VI muestra los datos experimentales y estimados (por el programa Estrip) de los niveles plasmáticos de Isoniacida, después de la administración oral de una solución de 500 mg a 7 sujetos sanos voluntarios.



GRAFICA 3. Recuperación de Isoniacida a partir de plasma.

Tabla V: Mínima concentración detectable de Isoniacida en agua y plasma

Conc. de Isoniacida mcg/ml	<u>A G U A</u>		<u>A B S O R B A N C I A</u>					C.V. (%)
						$\bar{x}$	S	
0.4	0.016	0.016	0.016	0.012	0.016	0.0152	0.00178	11.76
0.3	0.009	0.011	0.010	0.013	0.014	0.0114	0.00207	18.15
0.2	0.008	0.006	0.011	0.010	0.008	0.0086	0.00194	22.66
	<u>P L A S M A</u>							
0.4	0.008	0.019	0.008	0.011	0.009	0.011	0.0046	42.15
0.3	0.007	0.007	0.020	0.008	0.014	0.0112	0.00571	50.98

Tabla VI. Niveles plasmáticos de Isoniacida después de la administración de una solución oral conteniendo 500 mg a 7 sujetos sanos voluntarios

Tiempo (min)	S <sub>1</sub>		Tiempo (min)	S <sub>2</sub>		Tiempo (min)	S <sub>3</sub>		Tiempo (min)	S <sub>4</sub>	
	Conc. mcg/ml EXP	EST		Conc. mcg/ml EXP	EST		Conc. mcg/ml EXP	EST		Conc. mcg/ml EXP	EST
5	1.08	1.084				5	0.86	1.17	5	0.58	0.52
15	11.22	11.22	10	0.22	0.010	10	3.39	3.14	10	2.29	2.09
25	10.77	11.20	20	1.32	1.57	20	4.80	4.83	22	3.47	4.59
40	10.24	10.01	30	2.88	2.76	45	5.84	5.12	30	5.70	5.58
55	8.21	8.88	45	4.34	3.99	60	4.99	4.80	45	7.03	6.54
85	6.88	6.99	60	4.64	4.75	90	4.97	4.12	60	6.66	6.86
115	6.09	5.50	90	5.12	5.40	120	3.65	3.53	120	6.15	6.20
145	3.17	4.33	120	5.51	5.43	150	2.15	3.02	150	5.36	5.65
175	3.31	3.40	150	5.15	5.17	180	2.21	2.59	180	5.22	5.14
235	2.78	2.11	180	4.62	4.81	210	1.93	2.21	210	5.08	4.66
265	2.38	1.66	240	4.50	4.01	270	1.65	1.63	270	4.04	3.84
295	1.39	1.30	300	3.72	3.30	300	1.62	1.40	300	3.36	3.48
325	1.05	1.03	330	3.33	2.98	330	1.39	1.19	360	2.58	2.86
385	0.44	0.63	360	2.57	2.7	360	0.97	1.02	420	2.49	2.36
			390	2.12	2.44						

\* Se disolvió la Isoniacida en 50 ml de H<sub>2</sub>O

Cont.....

.... cont. Tabla VI.

S <sub>5</sub>			S <sub>6</sub>			S <sub>7</sub>		
Tiempo (min.)	Conc. mcg/ml EXP	EST	Tiempo (min.)	Conc. mcg/ml EXP	EST	Tiempo (min.)	Conc. mcg/ml EXP	EST
5	0.44		5	1.32	1.87			
10	2.43	3.35	10	4.82	4.33	10	1.37	1.84
20	8.24	8.04	20	6.17	7.63	20	5.62	4.34
30	7.93	10.35	30	10.74	9.42	30	4.25	6.17
45	7.32	11.26	45	10.07	10.42	45	8.91	8.00
60	6.09	10.63	90	7.65	8.89	60	8.78	9.05
90	4.26	8.00	120	7.11	7.17	120	11.11	9.65
120	3.04	5.49	150	5.36	5.66	---	---	
150	1.90	3.64	240	4.55	2.70	180	7.82	8.46
180	1.51	2.37	300	1.99	1.64	360	5.08	4.95
210	1.20	1.54	360	0.65	0.99	---	---	
345	0.5	0.21						

\* Se disolvió la Isoniacida en 50 ml de H<sub>2</sub>O

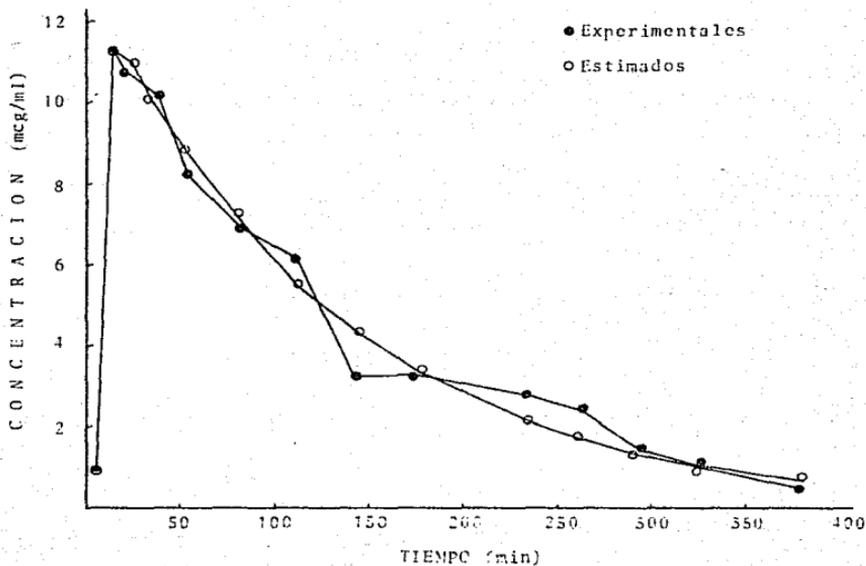
EXP = Resultados experimentales.

EST = Resultados estimados por el programa Estrip.

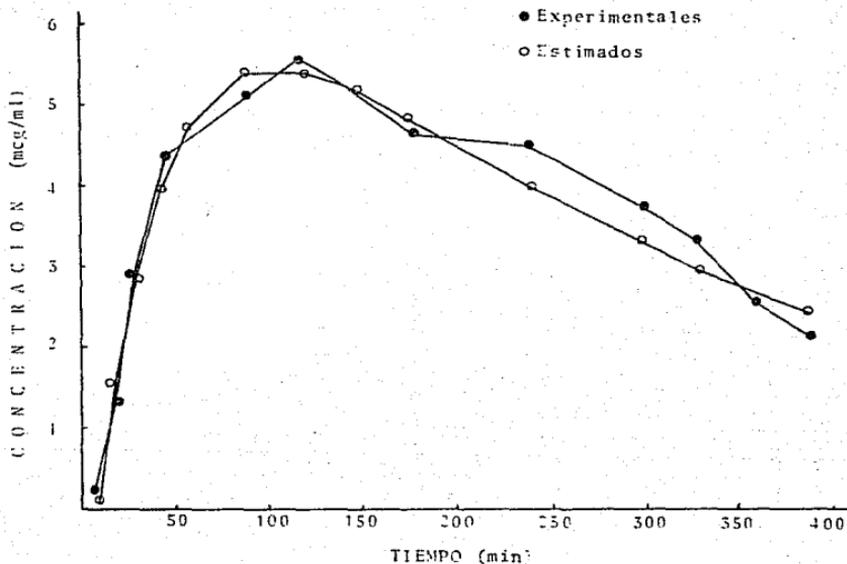
Las gráficas 4 - 10, muestran el curso temporal de los niveles plasmáticos (experimentales y estimados) para cada uno de los sujetos.

La tabla VII resume los parámetros farmacocinéticos de los sujetos que participaron en el estudio, tomados de los datos originales.

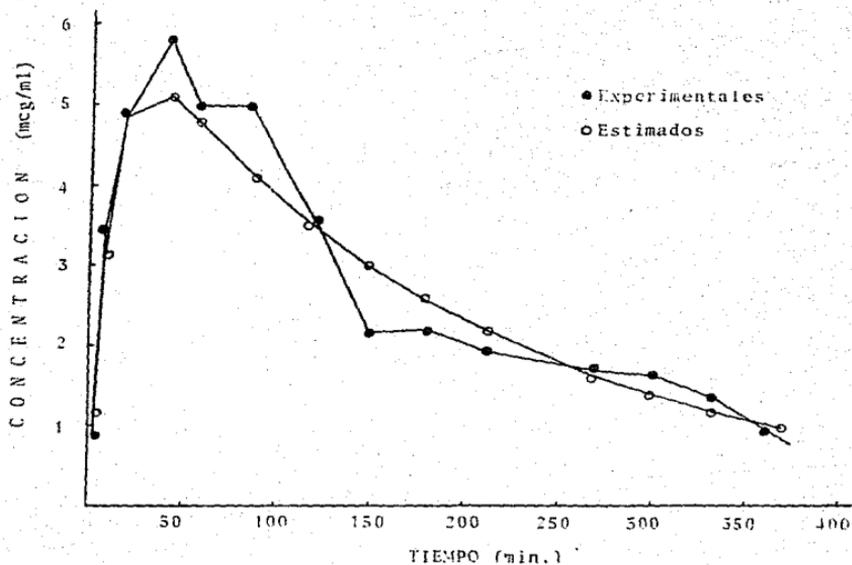
La gráfica No. 11, muestra los niveles plasmáticos estimados de isoniacida en los siete sujetos voluntarios.



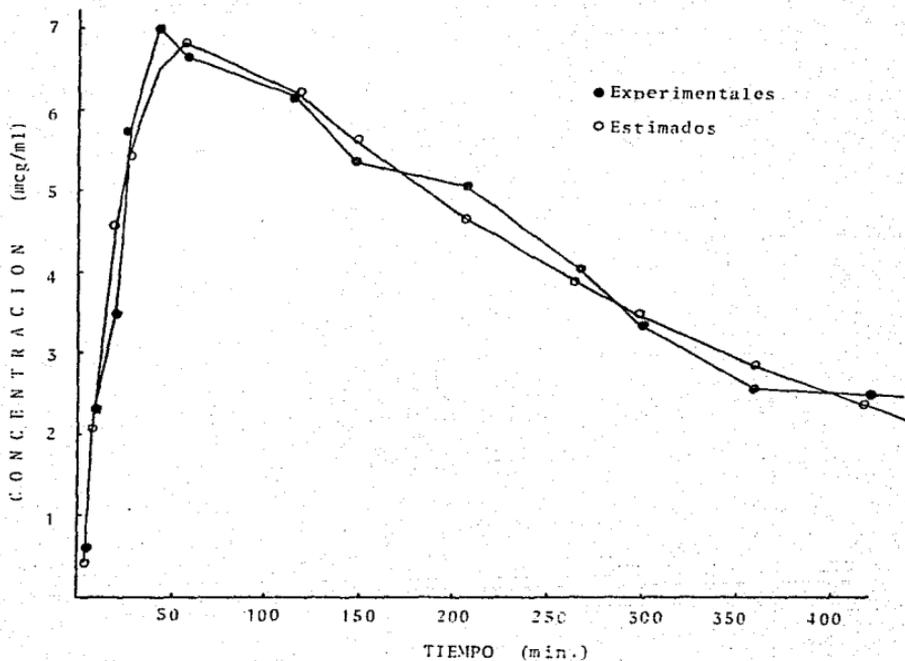
GRAFICA 4. Concentración plasmática de Isoniacida después de la administración oral de una solución que contenía 500 mg en el sujeto número 1.



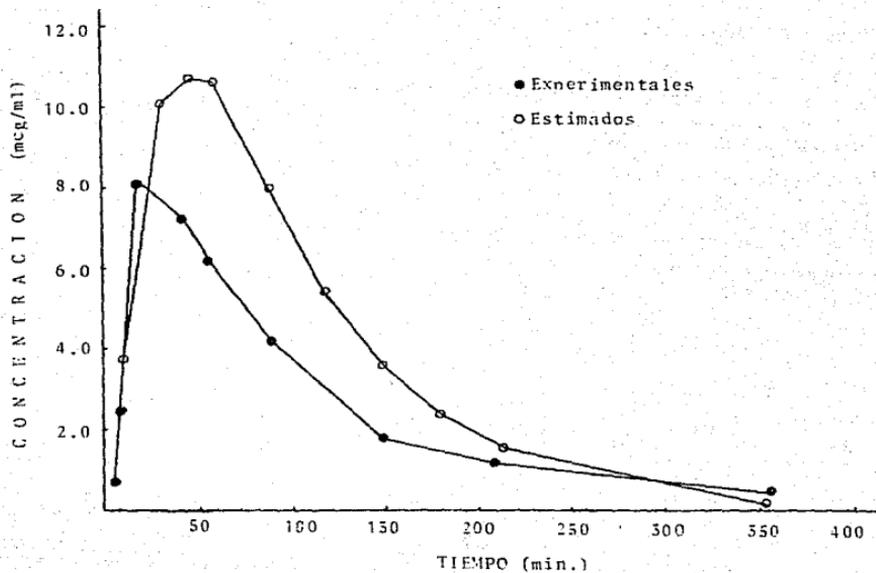
GRAFICA 5. Concentración plasmática de Isoniazid después de la administración oral de una solución que contenía 500 mg en el sujeto número 2.



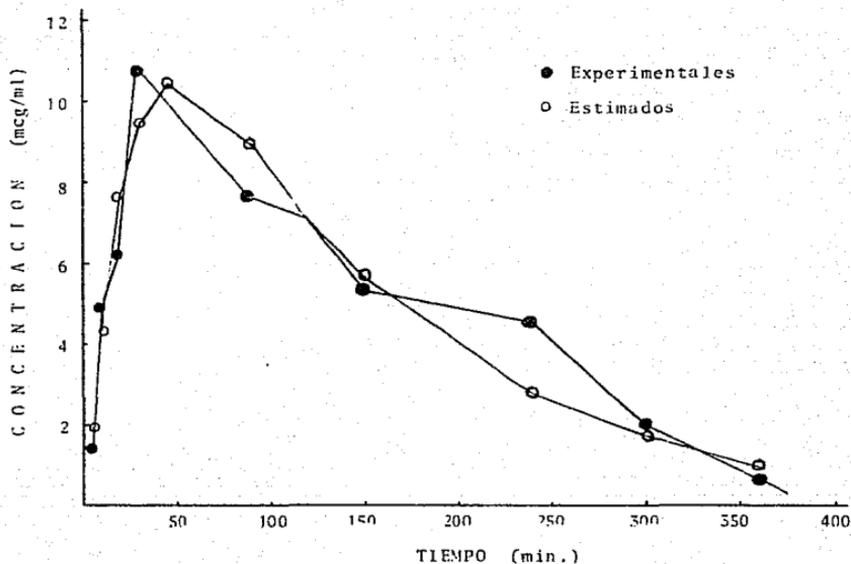
GRAFICA 6. Concentraciones plasmáticas de Isoniacida después de la administración oral de una solución que contenía 500 mg en el sujeto número 3.



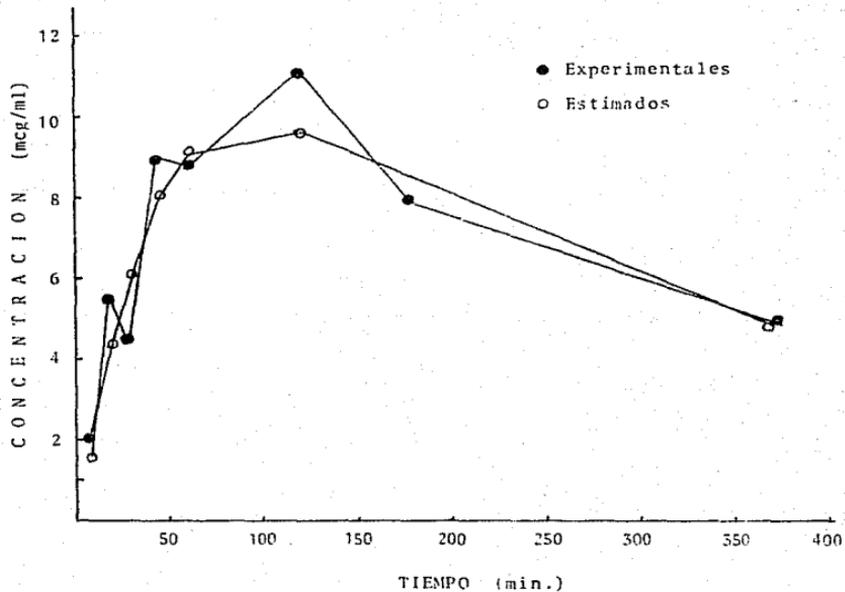
GRAFICA 7. Concentraciones plasmáticas de Isoniacida después de la administración oral de una solución que contenía 500 mg en el sujeto número 4.



GRAFICA 8. Concentración plasmática de Isoniacida después de la administración oral de una solución que contenía 500 mg en el sujeto número 5.



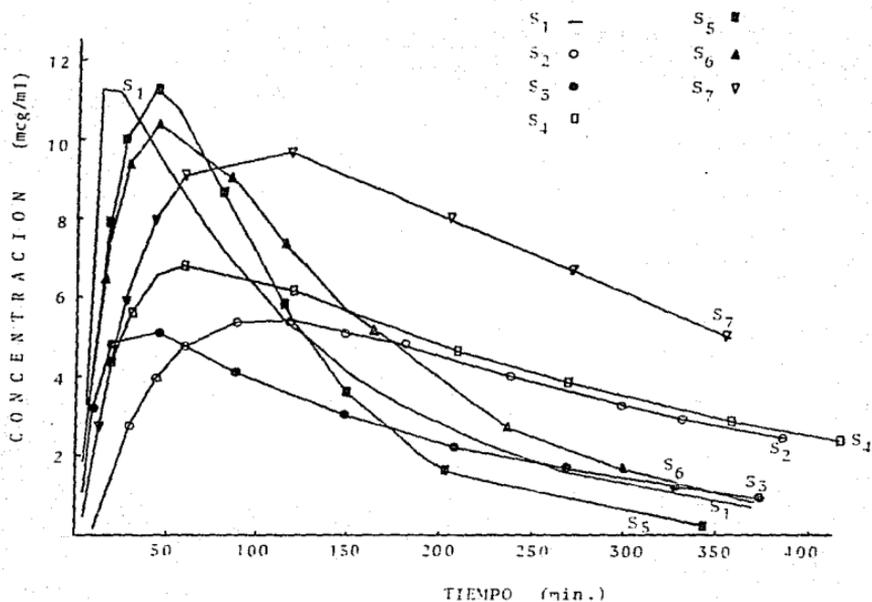
GRAFICA 9. Concentración plasmática de Isoniacida después de la administración oral de una solución que contenía 500 mg en el sujeto número 6.



GRAFICA 10. Concentración plasmática de Isoniacida después de la administración oral de una solución que contenía 500 mg en el sujeto número 7.

Tabla VII. Parámetros farmacocinéticos de la Isoniacida después de la administración oral de 500 mg en solución en sujetos sanos voluntarios.

Sujeto	MRT	$K_a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (min.)	$K_d$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{\text{max}}$ (min.)	$C_{\text{p max}}$ ( $\text{mcg/ml}$ )	$A B C_0^6$ hrs. ( $\text{mcg/ml min}^{-1}$ )
S <sub>1</sub>	118.62	0.1171	90.0	0.0077	15	11.22	1516.17
S <sub>2</sub>	189.28	0.0271	271.24	0.00319	120	5.43	1552.30
S <sub>3</sub>	146.42	0.1233	154.00	0.0045	45	5.12	995.822
S <sub>4</sub>	176.36	0.0655	234.91	0.00295	60	6.86	1860.87
S <sub>5</sub>	99.28	0.1475	74.516	0.0093	45	11.26	891.18
S <sub>6</sub>	132.22	0.0151	93.02	0.00745	45	10.42	1603.72
S <sub>7</sub>	250.88	0.0248	226.47	0.00306	120	9.64	2628.12



GRAFICA 11. Niveles plasmáticos de Isoniacida en los siete sujetos sanos voluntarios (Resultados estimados).

## 8. ANALISIS DE RESULTADOS

Nuestro intento inicial fue el de estandarizar la determinación de isoniacida en plasma en base al método espectrofotométrico reportado por Ellard y Gammon (4). Sin embargo, a pesar de haberse logrado reproducir, los inconvenientes son: el tamaño de muestra empleado, la cantidad y la desventaja de emplear 3 tipos de solventes de extracción, hicieron que se rechazara.

### 8.1. Validación del método analítico.

Empleando el método de Dymond (24) modificado con respecto a la agitación, se obtuvo una eficiencia de recuperación de isoniacida en plasma de 101.3 % para las concentraciones de 0.5 - 20 mcg/ml, lo cual es consistente con lo reportado en el artículo original de Dymond, con un 100 % de recuperación para las concentraciones de 1 y 10 mcg/ml. Así mismo, concuerda con los datos de Ellard y Gammon (4), donde obtienen la misma recuperación de isoniacida en agua y plasma. Otro autor, Stewart T. (20), reporta una eficiencia de recuperación de 82.7 %.

El C.V. obtenido en este estudio fue de 4.39 % en el intervalo de concentración de 0.5 - 20 mcg/ml, siendo comparable con lo reportado por Ellard y Gammon (4), que fue de - -

4.4. % en el intervalo de concentración de 0.5 - 10 mcg/ml.

De acuerdo con los resultados, el método es preciso y exacto.

Al evaluar en forma estadística el método fue lineal de acuerdo a la ley de Beer, en un intervalo de concentración de 0.5 - 20 mcg/ml, con un coeficiente de correlación de - 0.999, lo cual es comparable con lo obtenido por Ellard y Gammon (4), que indican que la desviación de la linealidad no fue significativa para el rango de concentración de 0.2- 1.0 mcg/ml y de 0.5 - 10 mcg/ml.

La concentración mínima detectable de isoniacida en plasma fue de 0.5 mcg/ml, con un coeficiente de 15.4, tomando como criterio de aceptación para los fines de este estudio, un coeficiente de variación de -20 %, siendo menor que la reportada en el artículo original (1 mcg/ml). Ellard y Gammon (4), detectan una mínima concentración de 0.3 mcg/ml, considerando como criterio dos veces la magnitud del blanco de plasma.

8.2. Niveles plasmáticos de isoniácida después de la administración oral de una solución en sujetos sanos voluntarios.

Mediante el criterio de Akaike (25), se determinó el modelo matemático que describe el comportamiento de los niveles plasmáticos de isoniácida, siendo el más adecuado el de un modelo abierto de un compartimiento, lo que concuerda con lo reportado en la literatura por Ellard y Gammon (26) y por Sued S. (6).

Una vez establecido el modelo matemático, se tomó como base el tiempo de vida media, para clasificar el tipo de acetilador al que pertenecen los sujetos del estudio. Tomando como criterio los reportes en la literatura que consideran que de 40-110 min, son acetiladores rápidos y de 140-240 min, son lentos, siendo así, los sujetos del estudio  $S_1$ ,  $S_5$ ,  $S_6$  son rápidos y  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ,  $S_7$  lentos (2,7,8,10,13).

Cuando se empleó el método de Dymond y Russell (24) para clasificar el tipo de acetilador encontramos que el promedio de los niveles plasmáticos de isoniácida tomados a las 5 horas después de la administración del fármaco para los inactivadores rápidos es de 3.0 mcg/ml y para los lentos de 5.8 mcg/ml, lo cual es comparable con lo reportado por el autor, donde menciona que los niveles son de 2.1 -

mcg/ml y de 5.0 mcg/ml para los rápidos y lentos respectivamente.

Las concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{p_{max}}$ ) encontradas, muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $t_{95\%}$ ), entre los dos grupos de acetiladores, sin embargo en la literatura se menciona que no existe diferencia, por lo que sería importante poder definir esto con un número mayor de sujetos.

El tiempo máximo ( $t_{max}$ ) para 6 sujetos se encontró entre 45-120 min, lo que concuerda con lo reportado en la literatura (5,6), uno de los sujetos presentó proceso de absorción más rápido y su  $t_{max}$ , fue de 15 minutos.

El promedio de la constante de absorción ( $K_a$ ) fue de  $0.0932 \text{ min}^{-1} \pm 0.0693$  y de  $0.060175 \text{ min}^{-1} \pm 0.04603$ , para rápidos y lentos respectivamente.

El promedio de la constante de eliminación ( $K_d$ ) fue de  $0.0081 \text{ min}^{-1} \pm 0.001$  y de  $0.0034 \text{ min}^{-1} \pm 0.0007$  para acetiladores lentos y rápidos respectivamente, las cuales concuerdan con lo reportado por Ellard y Gammon (26) de  $0.0086 \text{ min}^{-1}$  y  $0.0036 \text{ min}^{-1}$  para lentos y rápidos.

Considerando el área bajo la curva (ABC)<sub>0</sub><sup>6</sup> hrs no fue -

posible observar una diferencia estadísticamente significativa ( $t_{95} \frac{3}{2}$ ), entre acetiladores lentos y rápidos. La literatura menciona que si existe diferencia entre los dos tipos de acetiladores (27), pero tomando muestras hasta 24 horas.

El  $(ABC)_0^6$  hrs obtenida en el grupo de acetiladores lentos, fue comparable a la reportada por Sued (6). No fue posible realizar comparación de este parámetro farmacocinético en el grupo de acetiladores rápidos, por no encontrarse reportes.

Otro parámetro calculado, derivado de la teoría de momentos estadísticos fue el tiempo medio de residencia (MRT). Al agruparlos en base al tipo de acetilador se observó diferencia estadísticamente significativa ( $t_{95} \frac{3}{2}$ ) entre acetiladores lentos y rápidos.

## 9. CONCLUSIONES

El método de Dymond y Russell con algunas modificaciones, seleccionando entre varios de los métodos espectrofotométricos reportados, presentó características de exactitud, precisión, sensibilidad y linealidad, además de ser sencillo, lo cual nos permitió emplearlo con confiabilidad para los fines prácticos que se establecen en este estudio: determinación de los niveles de isoniacida en plasma, después de la administración oral de una solución, así mismo, fue de utilidad para la caracterización del comportamiento farmacocinético, el cual resultó ser adecuadamente descrito por el modelo abierto de un compartimiento.

El  $t_{1/2}$  obtenido para los 7 sujetos que participaron en el estudio, permitió clasificarlos en el grupo de acetiladores correspondientes (rápidos, lentos). Aunque la muestra para esto fue pequeña, no se presentaron ambigüedades para su ubicación.

No fue posible establecer la diferencia entre las áreas bajo la curva para los dos tipos de acetiladores debido a que la toma de muestras debió de prolongarse hasta las 24 horas, por lo menos para acetiladores lentos.

Las concentraciones plasmáticas máximas ( $C_{p_{max}}$ ), mos-

traron una diferencia estadísticamente significativa para los dos grupos de acetiladores.

Se cumplieron los objetivos planteados y se están - - asentando las bases para poder realizar el estudio a nivel clínico.

10. RECOMENDACIONES

- Es importante analizar las muestras el mismo día que se obtienen, si no se cuenta con un congelador (temp. -20°C), ya que la isoniacida presenta problemas de estabilidad en plasma.
  
- Tomar una muestra sanguínea a las 3 horas después de la administración de isoniacida para definir el tipo de acetilador.
  
- Muestrear un intervalo mínimo de 24 horas, sobre todo para los sujetos que pertenezcan al grupo de acetiladores lentos.

11. APENDICE I

Síntesis del Acido 2,4,6 Trinitrobencensulfónico  
(Picriilsulfónico)

A una solución caliente de ácido pícrico 22.9 g (0.1 mol) en 200 ml de etanol al 95 %, se le adicionó 7.9 g de piridina (8 ml ó 0.1 mol). El sólido formado se filtró, el producto se identificó como picrato de piridina, se obtuvo 30.1 g, 98 % de rendimiento (rend. lit.<sup>28</sup> 98 %) punto de fusión 165 - 167°C. (p.f. lit.<sup>28</sup> 166°C).

Se calentó a reflujo por 30 minutos una mezcla de 30 g (0.097 mol) de picrato de piridina, 10.3 g (0.067 mol ó 6.26 ml) de oxicloruro de fósforo y 70 ml de benceno. Se separaron las dos fases formadas (benceno-oleosa), se lavaron con agua caliente. Posteriormente se evaporó el benceno y se obtuvo el producto identificándose como cloruro de picrilo, de la fase oleosa se obtuvo el mismo producto con una pureza idéntica. La reacción dió 21 g, 84.83 % de rendimiento (rend. lit.<sup>28</sup> 98 %), punto de fusión 79-81°C. (p.f. lit.<sup>28</sup> 79-81°C).

Se calentó en un baño de vapor por 10 horas una mezcla de 10 g (0.04039 mol) de cloruro de picrilo y 10 g (0.0502 mol) de metabisulfito de sodio suspendidas en 120 ml de -

etanol absoluto, reemplazando el etanol que se evapora. Al término de la reacción se enfrió a 0°C y se filtró, el sólido formado se disolvió en 100 ml de acetona, y a esta solución se le adicionó 5 ml de ác. clorhídrico (conc.). El NaCl que precipitó se filtro, y el filtrado se evaporó a sequedad. El producto se recrystalizó por disolución - con una mínima cantidad de acetona caliente, adicionando cloroformo hasta que la cristalización concluyó, enfriándose a 0°C y obteniéndose un producto amarillo pálido, - que se identificó como el ácido 2,4,6 Trinitrobencensulfónico ( $C_6H_3N_3O_5 \cdot 4H_2O$ ) 7.1 g, 52.64 % rendimiento, punto - de fusión 170-174°C. (p.f. lit.<sup>29</sup> 174-177°C). (30).

12. APENDICE II

- $t_{1/2}$  = tiempo de vida media       $C_{p_{max}}$  = conc. plasmática máxima.  
 $K_a$  = constante de absorción  
 $K_d$  = constante de eliminación  
 $MRT$  = tiempo medio de residencia  
 $ABC$  = área bajo la curva

Intervalo para exactitud  $\bar{x} \pm \frac{S}{\sqrt{n}} t_1 - \frac{\alpha}{2}$

Intervalo para repetibilidad (precisión)  $\sqrt{\frac{(n-1) S^2}{X_1^2 - \frac{\alpha}{2}}} \sigma \sqrt{\frac{(n-1) S^2}{X_1^2 - \frac{\alpha}{2}}}$

Linealidad  $A \pm t \frac{\alpha}{2} S y/x \sqrt{\frac{X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$

$B \pm \frac{\hat{S} y/x}{S_x n-1} t_1 - \frac{\alpha}{2}$

- $CV$  = coef. variación  
 $\bar{X}$  = media  
 $S$  = desviación estándar  
 $S y/x$  = error típico de estimación

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

- $S_p$  = varianza ponderada.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Boxenbaum, G.H. and Riegelman, S.: Determination of isoniazid and metabolites in biological fluids. J. Pharm. Sci. 63 (8), 1191 - 1197, 1974.
2. Martindale. The Extra Pharmacopeia. 27 th edition, Staff. Great Britain, 1977. pp. 1591 - 1604.
3. Brewer, A.G. Isoniazid. In Florey, K. Analytical of drugs substances. Edit. Academic. N.Y. 6, 183-257, 1974.
4. Ellard, G.A. Gammon, T.P. and Wallace, M.S. The determination of isoniazid and its metabolites acetylisoniazid, monoacetylhydrazine, diacetylhydrazine, isonicotinic acid and isonicotinylglycine in serum and urine. Biochem. J. 126, 449 - 458, 1972.
5. Mandell, L.G. y Sande. A.M. Agentes antimicrobianos. Cap. 53 en: Goodman, L.S. and Gilman, A. Bases farmacológicas de la terapéutica. 7a. ed. Edit. Panamericana. México 1986, pp. 1142 - 1159.
6. Sued, S. Mc. Silveray, J.A. and Beaudoin. Bioavailability of three isoniazid formulations. J. Pharm. Sci. 66 (12), 1761 - 64, 1977.

7. Jenne, W.J. and Beggs, H.W. Correlation of in vitro - and in vivo kinetics with clinical use of isoniazid, - ethambutol, and rifampin. Amer. Resp. 107, 1013-1021, 1973.
8. Kunin, C.M. A guide to use of antibiotics in patients with renal disease. Annals of internal medicine. 67 (1), 151, 1976.
9. Goldstein, A. Aronow, L. Kalman, M.S. Farmacologia. Ed. Limusa. México, 1986, pp. 560 - 561.
10. Boxenbaum, G.H. and Riegelman, S. Pharmacokinetics of isoniazid and some metabolites in man. J. Pharmacokinet. Biopharm. 4 (4), 287 - 325, 1976.
11. Peters, J.M. Studies on the metabolic basis for the genetically determined capacities for isoniazid inactivation in man. C. Pharmacol. Exp. Ther. 150 (2), 298 - 304, 1965.
12. Timbrell, A.J., Wright, M.J. Monoacetylhydrazine as a metabolite of isoniazid in man. J. Clin. Pharm. Ther. 22, 602 - 608, 1977.
13. Ellard, G.A. Variations between individuals and populations in the acetylations of isoniazid and its significance for the treatment of pulmonary tuberculosis. Clin. Pharmacol. Ther. 19, 610 - 625, 1976.

14. Litter, M. Farmacología experimental y clínica. 6a. - edición. Ed. El Ateneo, Argentina 1980, pp. 1657-1664.
15. Control y tratamiento de la tuberculosis pulmonar. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Secretaría de Salud. México, 1987.
16. Bevan, A.J. Fundamentos de Farmacología. 2a. edición. Harla Harper Row. Latinoamericana. México 1982, pp. 623 - 626.
17. Katzung, G.B. Farmacología básica y clínica. 2a. edición. Edit. El Manual Moderno. México 1986, pp. 560-561.
18. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana 105, 34-44, 1988.
19. Organización Panamericana de Salud. III Seminario regional sobre tuberculosis: quimioterapia. Publicación No. 418, 1981.
20. Stewart, T.J. and Settle, A.D. Colorimetric determination of isoniazid with 9-chloroacridine. J. Pharm. Sci. 64, 1403 - 1405, 1975.
21. Allport, L.N. and Keyser, J.W. Colorimetric analysis. Vol. 1, 2a. edición. Chapman Hall LTD. Great Britan, London, 1957, pp. 214 - 216.

22. Poole, I.N. and Meyer, E.A. Comparison of new chemical method of determining isonicotinoyl hydrazide in serum with microbiological assay. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 98, 375, 1958.
23. Jenner, J.P. and Ellard, A.G. Determination of the isoniazid metabolite monoacetylhydrazine in urine by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. - 115, 188 - 196, 1987.
24. Dymond, L.C. and Russell, D.W. Rapid determination of isonicotinic acid hydrazide in whole blood with 2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic acid. Clin. Chem. Acta. 27, 513 - 520, 1970.
25. Yamaoka, K. Nakagawa, T. and Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. J. Pharmacokinetics Biopharm. 6, 165 - 175, 1978.
26. Ellard, G.A. and Gammon, T.P. Pharmacokinetics of isoniazid metabolism in man. J. Pharmacokinetics. Biopharm. 4, 83 - 113, 1976.
27. Davies, D.S. and Prichard, N.C. Biological effects of drugs in relation to their plasma concentration. A British Pharmacological Society Symposium. Great Britain - 1973, pp. 169 - 182.

28. Shirley, A.D. Preparation of organic intermediates. New York, John Wiley & Sons, Inc. Chapman & Hall. Ltd. USA, 1951, pp. 263.
29. Organic Syntheses collective. Vol. 5. John Wiley & Sons, Inc. USA, 1973, pp. 1101.
30. Golumbic, C. Fruton, S.J. and Bergamann. Chemical reactions of the nitrogen mustard gases. J. Org. Chem. 11, 518 - 535, (1946).
31. U.S. Pharmacopeia, 19 St. rev; 1974 Eaton Company: pp. 273, 671. 648.
32. Aldrich Chemical Co. 1984-1985. Catalog 1, Handbook of fine chemicals, pp. 894.
33. Lauterburg, B.H. et al. Pharmacokinetics of the toxic hydrazino metabolites formed from Isoniazid in humans. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 364-369, 1980.
34. Timbrell, A.J., Mitchell, R.J. Isoniazid hepatotoxicity: the relationship between covalent binding and metabolism in vivo. J. Pharmacol. Exp. Ther. 213, 364-369, 1980.
35. Gibaldi, M. Clinical Pharmacokinetics. 2a. edition. Lea & Febiger. Philadelphia USA, 1977, pp. 109.
36. Sadee Wolfgang, Beelen, C.M. Drug level monitoring. John Wiley & Sons. USA 1980, pp. 284.

37. Fry, J. Common diseases their nature incidence and care. 4a. edition. MTP Press limited USA 1985, pp. 22 - 25,
38. Hayes, E. La tuberculosis pulmonar y sus complicaciones: Editorial La Prensa Médica Mexicana, 1950, pp. - 434.
39. The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 10th edition. Merck Co. INC. USA, - 1983, pp. 746, 749.
40. Bay, A.I. La mortalidad en México. 1922-1975 (IMSS). Serie Manuales Básicos. México 1982, pp. 338-339.
41. Pacheco, R.C. and Olvera, C.R. Control de la tuberculosis (OPS). Publicación Científica No. 498. - - - Washington 1987..
42. Cuadro básico de medicamentos del sector salud. S.S.A. 1984, pp. 309 - 314.
43. Diccionario de especialidades farmacéuticas (PLM), 31a. edición, grupo editorial Mexicano. México 1985, pp. 123, 127, 273, 322, 558, 559, 593.
44. Boletín estadístico del Valle de México. INSS. anual 1981.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

45. Sayé, L. Tratamiento y profilaxis de la tuberculosis. Editores Salvat. México. 1958, pp. 540.
46. Wagner, G.J. Farmacocinética clínica, Editorial Reverté. España 1983, pp. 42 - 51.