

1083

732-4

Juzgada el 15-Marzo-1990

Calif: Tesina - Excellent

Grado - "Excellent"



APORTACION AL ESTUDIO DE LA ABSORCION DE QUINOLONAS

Memoria que, para optar al grado de
licenciatura en farmacia, presenta:

ELVIRA ESCRIBANO FERRER

Barcelona, 22 de Febrero de 1990.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701739433

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Núcleo Universitario de Pedralbes
08028 BARCELONA

Subunidad de Biofarmacia y Farmacocinética
Universidad de Barcelona

El que suscribe, Catedrático de Biofarmacia y Farmacocinética de la Facultad de Farmacia de Barcelona, CERTIFICA que la presente Memoria de Licenciatura, titulada:

"APORTACION AL ESTUDIO DE LA ABSORCION DE QUINOLONAS"

ha sido realizada bajo su dirección en la Subunidad de Biofarmacia y Farmacocinética de la Unidad de Farmacia Galénica del Departamento de Farmacia con el visto bueno del Director del Departamento y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Barcelona, 22 de Febrero de 1990.

El Director



Prof. Dr. D.
José Domenech Berrozpe

v^{to.} Bueno
Director del Departamento



Prof. Dr. D.
Claudio Faulí Trillo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi más profunda gratitud al Dr. D. José Domenech Berrozpe, Catedrático de Biofarmacia y Farmacocinética y director de esta Memoria, por su constante dedicación personal y ayuda prestada en la elaboración de la misma.

Al Profesor Dr. D. Rosendo Obach Vidal, quien con gran dedicación y afán de trabajo, unido a sus indudables conocimientos científicos, no ha dejado de aconsejarme en la realización de esta Memoria.

Al Profesor Dr. D. Joaquín Moreno Dalmau por su revisión crítica y sugerencias prestadas. A la Dra. Dña. Concepción Peraire. A ambos por sus aportaciones en el campo de la Informática.

Al Dr. D. Jacinto Lauroba Viladrosa por su ayuda inestimable en iniciarme en las técnicas experimentales utilizadas en el presente trabajo.

Deseo también agradecer y resaltar la colaboración de D. Joan Freixas Bazaco, Jefe del Departamento de Investigación y Desarrollo del Laboratorio CENAVISA S.A. (Reus), por su ayuda y facilidades de todo orden prestadas durante la realización de esta Memoria.

Quiero expresar a todos y cada uno de mis compañeros del Departamento de Biofarmacia y Farmacocinética, y en especial a Dña. Helena Colom, Dra. Dña. Ana C. Calpena y Dña. Marta Francitorra, mi más sincero agradecimiento por la desinteresada ayuda en todo momento prestada.

Y finalmente quiero agradecer a D. Antonio Guarner Aguilar su ayuda personal y estímulo constante a lo largo de todo el trabajo.

A mis padres y hermanos

INDICE**INTRODUCCION**

Objetivos y plan de trabajo	2
-----------------------------------	---

CAPITULO 1º

1. CONSIDERACIONES GENERALES DE LAS QUINOLONAS	4
1.1. Consideraciones químicas	4
1.2. Consideraciones farmacológicas	8
1.3. Características farmacocinéticas	12
1.3.1. Absorción	12
1.3.2. Distribución	16
1.3.3. Metabolismo	19
1.3.4. Excreción	22
1.3.5. Regímenes de dosificación	24
1.4. Consideraciones clínicas	27
1.4.1. Infecciones de las vías urinarias	27
1.4.2. Enfermedades venéreas	28
1.4.3. Infecciones de las vías respiratorias superiores	29
1.4.4. Infecciones de las vías respiratorias inferiores	29
1.4.5. Fibrosis quística	29
1.4.6. Diarreas	30
1.4.7. Infecciones de estructuras cutáneas	30
1.4.8. Osteomielitis	31
1.4.9. Otras indicaciones clínicas	31

1.4.10. Empleo profiláctico de las quinolonas	31
1.4.11. Efectos adversos	32

CAPITULO 2º

2. MATERIALES Y METODO	34
2.1. Cálculo de la constante de velocidad de absorción	34
2.1.1. Compuestos ensayados	34
2.1.2. Animales de experimentación	36
2.1.3. Método de perfusión	36
2.1.3.1. Material usual	37
2.1.3.2. Material especial	38
2.1.4. Aparatos auxiliares y de medida	39
2.1.5. Soluciones para ensayo	39
2.1.5.1. Solución para anestesia	39
2.1.5.2. Líquidos de lavado	40
2.1.5.3. Soluciones medicamentosas	40
2.1.6. Técnicas biológicas	41
2.1.6.1. Operaciones previas: anestesia	41
2.1.6.2. Técnica quirúrgica utilizada	42
2.1.6.3. Montaje de la preparación para la perfusión .	42
2.1.7. Metodología analítica	44
2.1.7.1. Toma de muestras y valoración del fármaco ...	44
2.2. Estudio de las variaciones de volumen de la solución medicamentosa	49
2.2.1. Técnica por centelleo líquido	50
2.2.1.1. Material usual y material especial para técnicas radiactivas	50

2.2.1.2. Aparatos especiales y de medida para la técnica radiactiva	51
2.2.1.3. Soluciones para ensayo en la técnica radiactiva	51
2.2.1.4. Determinación del ^{14}C -PEG 4000 por centelleo líquido	51
2.2.2. Método directo	55
2.3. Estimación de la constante de velocidad de absorción	56

CAPITULO 3º

3. RESULTADOS	58
3.1. Validación de la técnica analítica	58
3.2. Estudio de las variaciones de volumen de la solución medicamentosa	64
3.2.1. Técnicas radiactivas	64
3.2.2. Método directo	64
3.3. Estimación de la constante de velocidad de absorción	71
3.3.1. Concentraciones remanentes en el circuito de perfusión	71
3.3.2. Cálculo de la constante de velocidad de absorción	71
3.4. Estudio estadístico	82

CAPITULO 4º

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES	83
4.1. Discusión de los resultados	83
4.2. Conclusiones	85

<u>BIBLIOGRAFIA</u>	87
---------------------------	----

INTRODUCCION

En la actualidad, el diseño de las formas farmacéuticas está profundamente influenciado por los estudios biofarmacéuticos llevados a cabo con cada fármaco y por su farmacocinética, es decir, de los fenómenos a que está sometido el fármaco, tras su administración y su absorción a través de las membranas biológicas que comportan su posterior distribución por el organismo y eliminación del mismo, sea por secreción o biotransformación.

En los estudios biofarmacéuticos, el proceso de absorción del fármaco constituye uno de los temas de mayor relevancia, puesto que de su conocimiento se obtiene la información indispensable para el desarrollo y obtención de las formas farmacéuticas o formas de dosificación más idóneas según sea la vía de administración y la forma de dosificación empleada, y las características fisicoquímicas del fármaco, el fenómeno de la absorción será más o menos complejo y trascendente, pero su estudio por parte del farmacéutico responsable del diseño, contribuirá en todos los casos y en algunos de forma decisiva, a que sea posible modular el proceso, de forma que se desarrolle de acorde con las premisas que, teniendo en cuenta la forma farmacéutica escogida, coadyuven a la obtención de medicamentos seguros y eficaces.

En general, la vía oral es la más frecuentemente utilizada para la administración crónica de los fármacos, al considerarse que es, hasta cierto punto, la vía más fisiológica, al tiempo que es una de las más cómodas y quizás la que presenta menores inconvenientes para el paciente; estos motivos, entre otros, explican el hecho comprobado de que un elevado número de medicamentos del arsenal terapéutico actual se administren por vía oral.

Cuando tras unos estudios farmacológicos y toxicológicos más o menos exhaustivos se pone de manifiesto la potencialidad terapéutica de una sustancia o de una estructura que, químicamente, permite realizar distintas variaciones que pueden o de hecho modifican la actividad farmacológica del compuesto original de partida, la posible utilización clínica de cada uno de ellos mediante su administración por vía extravasal, concretamente por vía oral, deberá confirmarse previamente, por ejemplo, en un primer estadio, su capacidad de atravesar las membranas absorbentes que separan el lugar de absorción de la circulación sistémica, a partir de la cual tiene lugar, en general, la distribución del fármaco por todo el organismo, y en concreto permite su llegada al lugar de acción o biofase.

Resulta obvio que si un fármaco, tras su administración extravasal no puede acceder a la biofase a pesar de que presente una actividad farmacológica intrínseca comprobada, no será posible administrarse extravasalmente si se pretende una acción terapéutica sistémica. Así, en el caso de que el fármaco se administre por vía oral deberá atravesar el epitelio duodenal, puesto que constituye la barrera que lo separa de la circulación sistémica.

Puesta de manifiesto, pues, la relevancia del fenómeno de la absorción, resulta evidente que los estudios de absorción en animales de experimentación son casi siempre un paso previo y obligado para abordar el estudio del fenómeno en la especie humana y del mismo, sacar las conclusiones pertinentes que permitan un diseño óptimo en cada caso. Por una parte estos estudios que se utilizan para calcular la constante de velocidad de absorción, permiten dilucidar, a nivel comparativo, las diferencias en la absorción que presentan una serie de fármacos potenciales pertenecientes, por ejemplo, a una serie homóloga con análogas propiedades farmacológicas y, por otra, también permiten, a menudo, seleccionar de entre diversos excipientes los que pueden resultar más idóneos respecto a su influencia en la modulación de la absorción del fármaco junto al cual deben configurar la forma de dosificación definitiva y segura. Por estos motivos, en un estudio de absorción con animales de experimentación puede y debe seleccionarse la técnica que se considera como más apropiada para la finalidad de aquél.

En general, la constante de velocidad de absorción de los fármacos puede determinarse por métodos directos o por métodos indirectos; los primeros permiten calcular este parámetro en función de las cantidades remanentes de fármaco en el lugar de absorción y, los segundos a partir de las curvas de niveles plasmáticos. Es obvio que en humanos no pueden utilizarse los métodos directos y éstos se circunscriben a ensayos con animales de experimentación. En la presente Memoria se pretende estimar el valor de la constante de velocidad de absorción de una serie de fluoquinolonas mediante un método directo, utilizando la rata como animal de experimentación. La metódica a utilizar en el presente trabajo es un método de perfusión "in situ" adaptado a nuestras condiciones experimentales. Los fármacos sometidos a estudio, forman parte de una serie de fluoquinolonas algunas de ellas de interés y utilidad clínica y también incluye dos componentes en fase de experimentación, no comercializados en la actualidad.

El plan de trabajo de la presente Memoria, puede esquematizarse en los siguientes puntos:

a) Puesta a punto de una metódica de perfusión "in situ" para el cálculo de la constante de velocidad de absorción.

- b) Estimación de la constante de velocidad de absorción de los fármacos sometidos a estudio mediante la metodología precedente.
- c) Estudio estadístico comparativo de los resultados obtenidos, en particular, de las diferentes constantes estimadas para cada componente de la serie estudiada.
- d) Discusión y conclusiones del trabajo realizado.

CAPITULO 12

1. CONSIDERACIONES GENERALES DE LAS QUINOLONAS

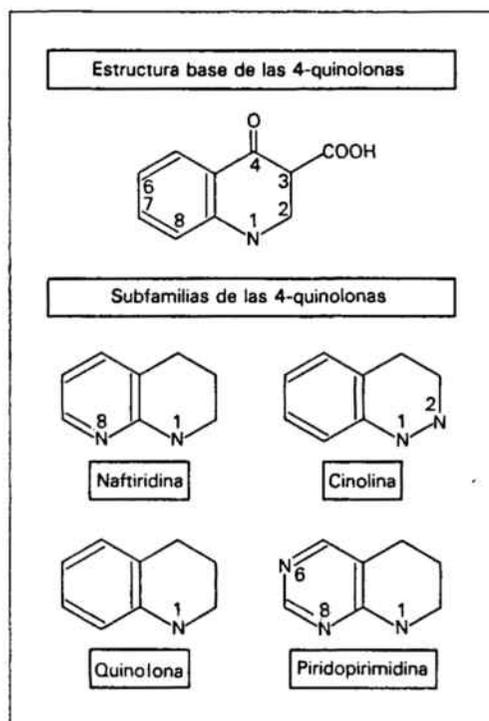
1.1. CONSIDERACIONES QUIMICAS

Las quinolonas que constituyen un grupo de fármacos antibacterianos derivados del núcleo central 4-quinolona-3-carboxílico no son, en realidad, dentro del arsenal terapéutico, sustancias que puedan considerarse actualmente como novedades terapéuticas. Hace más de una década, los ácidos nalidíxico y oxolínico fueron incluidos en la práctica clínica como útiles agentes antisépticos urinarios, siendo su utilización aún hoy día vigente. En estos últimos años se han incorporado al grupo algunos derivados con ciertas características especiales, como los ácidos pipemídico, piromídico, la cinoxacina, la rosoxacina o la flumequina, pero no han aportado sus modificaciones estructurales diferencias cualitativas. Las investigaciones químicas en este campo, han cristalizado en una serie de compuestos que bajo la denominación genérica de 4-quinolonas, propuesta por Smith (1) en 1984, configuran un grupo terapéutico de amplia utilización en la práctica clínica diaria.

La estructura química básica de las quinolonas se expone en la FIGURA 1 y la más simple de ellas corresponde al ácido nalidíxico con un radical metilo en posición 7. Se concretó que el ácido carboxílico presente en la molécula así como los átomos de oxígeno vecinos son los responsables de la actividad antibacteriana (2) y, a partir de esta estructura básica se investigaron distintos sustituyentes en la molécula susceptibles de mejorar sus propiedades terapéuticas.

El primer sustituyente efectivo fue un átomo de flúor situado en posición 6, hecho éste, que no sólo aumenta la actividad terapéutica de estos compuestos sino que fue la génesis de una nueva serie de fármacos antibacterianos: las fluoquinolonas.

Básicamente, desde un punto de vista estructural, todas las quinolonas provienen del núcleo fundamental del ácido 4-quinolona-3-carboxílico. Sin embargo, entre los numerosos análogos investigados, es frecuente la introducción de isómeros en el núcleo, dando lugar a otros núcleos químicamente diferenciados. Los núcleos químicos mayoritariamente ensayados en la síntesis de nuevas quinolonas, se exponen en el CUADRO I (3, 4).

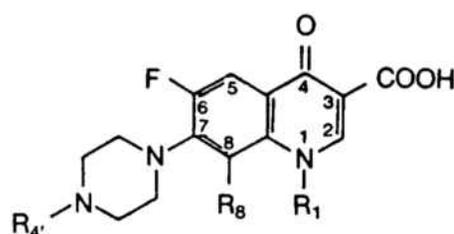


Núcleos de sustitución mayoritariamente utilizados en la síntesis de las quinolonas.

CUADRO I

Debe constatar que, con mucho, el núcleo más utilizado corresponde al más básico, el de la quinoleína, especialmente dentro de las fluoquinolonas.

Con respecto a los radicales sustituyentes, es importante considerarlos de forma separada, teniendo en cuenta su situación en uno u otro ciclo aromático del doble anillo que poseen las quinolonas (FIGURA 1). Los correspondientes al anillo piridínico son esenciales para la actividad terapéutica de estos compuestos y resultan, por tanto, insustituibles, esta premisa corresponde a los radicales siguientes: el grupo carbonílico en 4, el grupo carboxílico en 3 y la N- alquilsustitución (un grupo alifático de pocos eslabones).



PRODUCTO	ESTRUCTURA QUIMICA		
	R ₁	R ₈	R ₄
AMIFLOXACINA	-NH-CH ₃	H-	-CH ₃
CIPROFLOXACINA	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{-CH} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	H-	-H
ENOXACINA	-CH ₂ -CH ₃	(*)	-H
NORFLOXACINA	-CH ₂ -CH ₃	H-	-H
OFLOXACINA	$\begin{array}{c} \text{-CH-CH}_2\text{-O-} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$		-CH ₃
PEFLOXACINA	-CH ₂ -CH ₃	H-	-CH ₃

NOTA: La enoxacina tiene un núcleo naftiridinico, en lugar del quinolinico, diferenciándose de éste por la presencia de un segundo átomo de N, en posición 8. Por este motivo, la enoxacina no tiene posibilidad de sustitución (R₈).

Estructura comparada de las fluoquinolonas.

FIGURA 1

Los sustituyentes del anillo aromático adyacente son, por contra, moduladores de la actividad antibacteriana. Un aspecto extremadamente interesante de estas sustituciones es que sus repercusiones farmacológicas vienen determinadas de forma acoplada. En este sentido las posiciones 6 y 7 son las que en la mayoría de los casos, determinan la amplitud del espectro antibacteriano y la potencia de actividad bactericida. Así, la introducción de un átomo de flúor en 6, responsable de un marcado incremento del espectro antibacteriano, de poco o nada sirve sino va acompañado por la sustitución en 7 de un heterociclo nitrogenado (preferiblemente piperazina, N-metilada o no) (5). La operación inversa produce exactamente el mismo efecto. Se pueden comentar, en este sentido, ejemplos en los dos sentidos: la flumequina dispone de un flúor en posición 6 y, sin embargo, su espectro antibacteriano no es

cualitativamente diferente del correspondiente al ácido nalidíxico. Tampoco existen diferencias esenciales con los ácidos pipemídico y piromídico, que tienen en la posición 7 agrupamientos piperazínico y pirrolidínico, respectivamente.

Las sustituciones isostéricas en el núcleo fundamental quinoleínico no afectan prácticamente al efecto farmacológico. Incluso la introducción de un segundo y tercer nitrógeno, suponen una reducción del efecto, aunque no del espectro. Sin embargo, en algún caso, tales sustituciones isostéricas conducen a mejoras de carácter farmacocinético. Este es el caso de la cinoxacina, un isómero en posición 2 del ácido oxolínico, al que supera ampliamente en términos de biodisponibilidad oral, un aspecto altamente interesante desde la perspectiva terapéutica (6).

También tiene interés desde un punto de vista estructural la formación de moléculas rígidas (que no permiten las fluctuaciones en vaivén y rotacionales de los radicales), en la medida que permiten conocer los condicionamientos y necesidades estructurales para desarrollar su actividad antibacteriana. En este sentido, cabe citar a sustancias como la flumequina y algunos derivados (s- 25930 y s- 25932) y a la ofloxacina.

Las características estructurales de las quinolonas, confieren a sus moléculas carácter anfotérico hecho que se traduce en un cierto grado de variabilidad en el efecto bactericida en función del pH del medio. Puede afirmarse, en términos generales, que estos productos son más activos en medio alcalino que en medio ácido. Esto es especialmente cierto para la norfloxacina y la ciprofloxacina, cuya máxima actividad bactericida se produce a pH 8, mientras que en el resto de fluoquinolonas se produce a pH 7.2 (7). Entre los nuevos productos, la difloxacina, irtoxacina y E- 3499 son más activos en medio ácido (pH alrededor de 6.4), motivo por el cual su actividad es mayor en orina (normalmente de débil reacción ácida) (8).

Finalmente, se pueden establecer dentro de la serie de fluoquinolonas algunas relaciones estructura/actividad ilustrativas respecto a la estructura de estas sustancias frente a su actividad antimicrobiana. Estas relaciones pueden concretarse en las siguientes (9):

- Norfloxacina/Enoxacina: Isómeros en posición 8. Similar espectro y potencia. Mejores cualidades farmacocinéticas con el anillo naftiridínico (enoxacina).
- Amifloxacina/Pefloxacina: Sustitución del N-metilo por un agrupamiento de tipo hidrazínico (amifloxacina) en posición 1. Pérdida de potencia bactericida y empeoramiento farmacocinético.

- Norfloxacin/Peefloxacin: N-metilación del N₄ del radical piperazínico en 7. Aumento de la actividad bactericida y notoria mejora de las cualidades farmacocinéticas. Como veremos en algún caso posterior, el efecto sobre la actividad bactericida no se produce siempre en este sentido, por lo que parece tratarse, nuevamente, de un fenómeno de acoplamiento de varios radicales.

- Peefloxacin/Fleroxacin: Introducción de dos átomos adicionales de flúor (en el carbono terminal del N₁-etilo y en posición 8). Supone un aumento de la potencia bactericida.

- Norfloxacin/Ciprofloxacina: Sustitución del radical etilo en 1, por otro de ciclopropilo. Se traduce en un considerable incremento del espectro y de la potencia bactericida. Las características farmacocinéticas mejoran ligeramente.

Hay otras modificaciones estructurales de interés, como la sustitución en 1 de un radical 4-fluorofenilo (difloxacina), o núcleos pirrolidínicos polisustituídos en posición 7 (AT-3295, AT-3765, CI-934), o heterociclos nitrogenados insaturados (pirrol: irloxacina, E-3499; imidazol: S-25932). Sin embargo, no parece, a tenor de los datos disponibles, que dichas sustituciones se traduzcan en mejoras farmacodinámicas o farmacocinéticas significativas.

1.2. CONSIDERACIONES FARMACOLOGICAS

La actividad farmacológica de las quinolonas se centra básicamente bloqueando un enzima implicado en el control de la topología del ADN bacteriano. Esta es gobernada por topoisomerasas bacterianas, dentro de las cuales la topoisomerasa II o ADN girasa es la verdadera diana de estos agentes (10, 11, 12, 13). La ADN girasa tiene como función especial catalizar la conversión de la estructura en "reposo" del ADN bacteriano que consiste en un anillo cerrado por enlaces covalentes en la forma adecuada para la replicación del material nuclear.

Este proceso consiste en la introducción en la doble cadena de ADN de arrollamientos superhelicoidales negativos. Esta reacción genera tensión en la doble hélice, favoreciendo el desenrollamiento de las dos cadenas del ADN. Asimismo, la ADN girasa permite la apertura y el cierre de los dos dobles círculos de ADN que se encuentran enganchados. Todos estos procesos requieren un importante aporte de energía que proviene de la degradación de ATP. Se ha sugerido también que el enzima permite reducir la tensión topológica acumulada durante el proceso de replicación (14).

La ADN-girasa, está formada por cuatro subunidades, dos A (cada una de un peso molecular de 100 kilodaltons) y dos B (cada una con 90 kilodaltons). Se postula, que las quinolonas se unen selectivamente a las unidades A, cuya función es formar un enlace covalente con el ADN bacteriano y, como consecuencia, impiden su desenrollamiento. Las unidades B del enzima están implicadas en el aporte energético del proceso, por degradación de ATP. Estas unidades B son el punto de actuación de algunos antibióticos como la novobiocina o la cumermicina.

Algunos autores han sugerido (15) que las fluoquinolonas podrían actuar como bactericidas más como consecuencia de una sobreactividad de la topoisomerasa I, provocada por el bloqueo de la topoisomerasa II (ADN-girasa), que directamente por este efecto. También se ha sugerido, a través de ciertas evidencias experimentales obtenidas sobre cultivos de Staphylococcus aureus, que las fluoquinolonas podrían unirse directamente a la propia cadena de ADN, justamente en los puntos donde se une la ADN-girasa.

Es importante considerar que el centro de acción de estos fármacos es un enzima exclusivamente bacteriano, lo que supone la ausencia del correspondiente efecto en las células humanas (no obstante, hay un enzima celular humano, que ejecuta alguna de las funciones de la ADN-girasa bacteriana, pero es estructural y funcionalmente diferente; de hecho no se ha observado ningún tipo de unión entre las quinolonas y este enzima humano).

Respecto al espectro antibacteriano de las quinolonas debe concretarse que la actividad de las quinolonas tradicionales está centrada básicamente en las enterobacterias (y no todas las especies). La síntesis de las fluoquinolonas supuso un importante incremento en el espectro antibacteriano; estos nuevos fármacos, actúan también sobre especies de enterobacteriáceas poco sensibles a las quinolonas convencionales, tales como *Klebsiella* y *Serratia*. Actúan también sobre otras bacterias gramnegativas aeróbicas poco sensibles, como Pseudomonas aeruginosa o *Acinetobacter*.

También son activas sobre bacterias y cocos grampositivos, aunque con menos intensidad que sobre los gramnegativos. Otro tanto ocurre con los microorganismos anaeróbicos, cuya sensibilidad a las fluoquinolonas puede catalogarse como de moderada. Algunas fluoquinolonas presentan una estimable actividad frente a *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Nocardia* y *Legionella*.

Entre las fluoquinolonas, aquellas con más amplio espectro y potencia son la ofloxacina y ciprofloxacina. En términos comparativos las fluoquinolonas constituyen uno de los grupos de agentes antiinfecciosos con más amplio espectro,

equiparable a antibióticos de la importancia terapéutica del imipenem o la ceftazidima.

Una valoración del espectro antibacteriano de las fluoquinolonas se expone en el CUADRO II.

Respecto a la resistencia bacteriana de las quinolonas, cabe comentar, que las fluoquinolonas no tienen resistencia cruzada con las quinolonas convencionales, aunque sí entre ellas mismas. Esta resistencia parece estar exclusivamente mediada por mutaciones cromosómicas en la bacteria, justamente en el gen que codifica para síntesis de subunidades A de la ADN-girasa. No se han observado plásmidos codificadores de resistencia, ni otros procesos de transferencia de la resistencia bacteriana.

Se han descrito, ocasionalmente, procesos de resistencia bacteriana debidos a una reducción de la permeabilidad de la pared y membrana bacteriana a las fluoquinolonas. Se trata, no obstante, de casos observados en cepas bacterianas resistentes a otros antibióticos. Pero lo que no ha sido observado, en ningún caso, es una inactivación enzimática al estilo de la registrada por los antibióticos beta-lactámicos, aminoglucosídicos, etc. Generalmente se han observado resistencias en cepas bacterianas también resistentes a otros antibióticos; pero lo que no se ha observado es una inactivación enzimática por parte de bacteria alguna (16,17).

Microorganismo	Amifloxacina	Ciprofloxacina	Enoxacina	Norfloxacina	Ofloxacina	Pefloxacina	Acido nalidixico
Enterobacteriáceas: (1)							
- <i>Enterobacter cloacae</i> (3)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,6	0,6
- <i>Escherichia coli</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,6
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,0	1,0	0,6	1,0	1,0	0,6	0,1
- <i>Proteus vulgaris</i>	0,6	1,0	1,0	1,0	1,0	0,6	0,6
- <i>Salmonella typhi</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,6	0,3
- <i>Serratia marcescens</i> (3)	0,6	1,0	1,0	0,6	1,0	0,6	0,1
VALOR ESPECTRAL PARCIAL (2)	79	100	94	84	100	64	30
Otros bacilos y cocos Gram (-), aeróbicos y anaeróbicos facultativos:							
- <i>Acinetobacter sp.</i>	0,6	0,6	0,3	0,3	0,6	0,6	0,6
- <i>Haemophilus influenzae</i> (3)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
- <i>Legionella pneumophila</i>	0,6	1,0	0,6	0,6	1,0	0,6	0,6
- <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,6	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,6
- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (3)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,0
VALOR ESPECTRAL PARCIAL (2)	69	78	62	62	78	66	40
Cocos y bacilos Gram (+) aeróbicos y anaeróbicos facultativos:							
- <i>Staphylococcus aureus</i> (3)	0,6	1,0	0,6	0,6	1,0	1,0	0,0
- <i>Streptococcus faecalis</i> (3)	0,3	1,0	0,3	0,3	0,6	0,6	0,0
- <i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,3	0,6	0,3	0,3	0,6	0,1	0,0
- <i>Streptococcus pyogenes</i>	0,0	0,6	0,1	0,1	0,6	0,1	0,0
- <i>Streptococcus viridans</i>	0,1	0,6	0,1	0,3	0,6	0,6	0,0
VALOR ESPECTRAL PARCIAL (2)	29	82	31	33	69	48	0
Bacilos y cocos anaeróbicos:							
- <i>Bacteroides fragilis</i> (3)	0,0	0,3	0,0	0,0	0,6	0,3	0,0
- <i>Clostridium sp.</i>	0,3	0,3	0,6	0,0	0,3	0,6	0,0
- <i>Fusobacterium sp.</i>	0,3	0,3	0,1	0,0	0,3	0,1	0,0
- <i>Peptostreptococcus sp.</i>	0,3	0,3	0,3	0,0	0,6	0,3	0,0
VALOR ESPECTRAL PARCIAL (2)	10	30	10	0	47	27	0
Actinomicetos:							
- <i>Nocardia asteroides</i>	0,0	0,3	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
VALOR ESPECTRAL PARCIAL (2)	0	30	10	0	10	0	0
VALOR ESPECTRAL GLOBAL (2)	52	76	55	52	76	57	24

(1) La asignación de los coeficientes individuales de actividad antibacteriana se ha hecho de acuerdo con la siguiente tabla de valores; según la distribución modal de los valores de C.M.I. 90 por 100 (expresada en mcg/ml):

CMI ₉₀	<	1 mcg/ml	=	1,0
"	<	8 "	=	0,6
"	<	32 "	=	0,3
"	=	32 "	=	0,1
"	>	32 "	=	0,0

(2) El cálculo de los valores espectrales (parciales y global) se ha realizado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$VE = \left[\frac{\sum x_i - 2 \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x_i)^2}{N}}}{N} \right] \cdot 100$$

(3) El coeficiente de actividad antibacteriana frente a estos microorganismos pondera el triple, en razón de su trascendencia patológica y diferencial.

Valoración espectral de fluoquinolonas.

CUADRO II

1.3. CARACTERISTICAS FARMACOCINETICAS

En estos últimos años la farmacocinética se ha ido incorporando progresivamente a los criterios clínicos y microbiológicos que tradicionalmente presidían la implantación de una terapéutica antiinfecciosa, de tal forma que en la actualidad no es posible un diseño racional de los regímenes de dosificación de agentes antimicrobianos y, en general, de cualquier fármaco, sin conocer los parámetros que definen su cinética de disposición.

Revisamos, a continuación, el LADME de las fluoquinolonas, es decir, el perfil farmacocinético de estos agentes antiinfecciosos.

1.3.1. ABSORCION

Característica común de las nuevas quinolonas es su buena absorción a nivel gastrointestinal, lo que permite su administración por vía oral (18). La absorción oral de las quinolonas se realiza mediante un proceso de absorción pasiva, es decir, por un proceso de primer orden, siendo la absorción óptima cuando estos fármacos se hallan disueltos en el lumen intestinal a un pH comprendido entre 6.5 y 7.0 (19).

La biodisponibilidad absoluta en magnitud de las quinolonas presenta un valor promedio del 80%, presentando valores superiores la enoxacina (90%), fleroxacina (100%), ofloxacina (95%) y pefloxacina (100%), siendo la norfloxacina la que presenta un valor más bajo (40%) (20).

Fármaco	Dosis(mg)	Formulación	F%
Ciprofloxacina	200	comprimidos	69 ± 7
	500	comprimidos	59.6 ± 12.4
Enoxacina	400	comprimidos	79.5 ± 18.4
	200	cápsulas	87
Fleroxacina	400	comprimidos	99 ± 14
Norfloxacina	400	comprimidos	30-40
Ofloxacina	200	comprimidos	96
Pefloxacina	400	comprimidos	98 ± 20
	600	comprimidos	91.0 ± 13.3
Ac. pipemídico	100	comprimidos	93.1 ± 11.4

Biodisponibilidad de las quinolonas tras su administración oral.

CUADRO III

Un resumen de la biodisponibilidad de las quinolonas formuladas en formas farmacéuticas sólidas de administración oral se expone en el CUADRO III (21, 22).

Asumiendo que en la absorción oral de las quinolonas no influyen los factores inherentes al diseño biofarmacéutico de la formulación, las diferencias en la absorción de estos fármacos es posible sea debido a sus características fisicoquímicas como el pK_a , su lipofilia, etc. (19).

Respecto a la biodisponibilidad en velocidad de estos fármacos, cabe concretar que su absorción es generalmente rápida, alcanzándose la concentración plasmática máxima (C_{max}) entre 1 y 3 horas después de su administración. Para dosis equivalentes, norfloxacin y ciprofloxacina son las que presentan valores inferiores de C_{max} , pefloxacina y enoxacina valores intermedios y ofloxacina el valor más elevado entre 10-11 $\mu\text{g/ml}$ para una dosis de 600 mg, lo que representa un valor para este parámetro del orden de cuatro o cinco veces superior a los otros derivados tal como se expone en el CUADRO IV (23, 24).

Fármaco	Dosis (mg)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	T_{max} (h)
Ciprofloxacina	500	1.9 - 2.9	1
Enoxacina	600	3.7	1 - 3
Norfloxacina	400	1.5	1 - 2
Ofloxacina	600	10 - 11	1 - 2
Pefloxacina	400	3.8	1 - 3

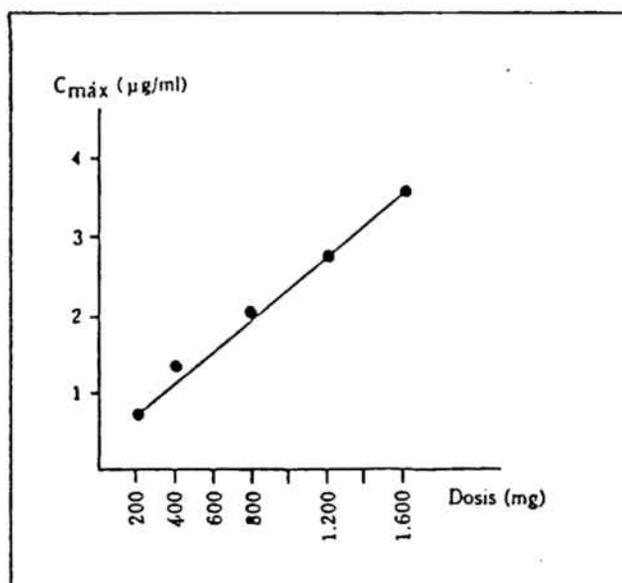
Niveles séricos de quinolonas en humanos.

CUADRO IV

Los estudios realizados demuestran que la constante de velocidad de absorción (K_a), es similar para todas las quinolonas concretándose sus valores entre 2.1 y 3.2 h^{-1} (25). El valor de t_{max} , como se ha comentado anteriormente, es similar en todas las formulaciones estudiadas, alrededor de dos horas. Las diferencias en las concentraciones plasmáticas máximas alcanzadas reflejan, aunque sólo sea parcialmente, el grado de absorción gastrointestinal, correspondiendo los valores más elevados de biodisponibilidad a las que presentan concentraciones plasmáticas máximas más altas cuando se administran por vía oral. Por otra parte, aquellos derivados a los que corresponden valores más bajos de C_{max} son los que alcanzan concentraciones más elevadas en heces (norfloxacina 773 $\mu\text{g/g}$ y ciprofloxacina 891 $\mu\text{g/g}$) (26), lo que en principio sugiere que un elevado porcentaje de la dosis administrada no se absorbe;

sin embargo, no hay que olvidar que en la excreción biliar puede contribuir, en mayor o menor grado, la elevada presencia de ciprofloxacina y norfloxacina en heces.

Es importante resaltar, que el grado de absorción de estos compuestos, administrados por vía oral, no parece modificarse por las dosis administradas (27, 28). La relación lineal establecida entre el C_{max} y la dosis administrada para la norfloxacina, se representa en la FIGURA 2. El rango de dosis estudiado es de 200 a 1600 mg. Para otras quinolonas se han establecido relaciones análogas que permiten predecir el incremento que experimentarán los niveles en plasma en función de la dosis administrada.



Relación entre la concentración plasmática máxima y la dosis administrada de norfloxacina.

FIGURA 2

Respecto a las interacciones farmacocinéticas de las quinolonas a nivel de la absorción, cabe comentar, que la administración conjunta de estos agentes antibacterianos con alimentos produce un retraso en su absorción (29) de forma similar a lo que ocurre con otros antibióticos. Un ejemplo representativo de este hecho se expone en el CUADRO V.

Se puede observar en este cuadro los valores de C_{max} y t_{max} de ofloxacina cuando se administra a la dosis de 200 mg con y sin alimentos. Se pone de manifiesto un retraso en la absorción; t_{max} pasa de 0.83 a 1.85 horas con la consiguiente disminución del valor de C_{max} . Para el resto de quinolonas se

han observado variaciones similares (5).

	C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	T_{\max} (h)
Administración en ayunas	2.24	0.83
Administración junto con alimentos	1.56	1.85

Influencia de los alimentos en la absorción de ofloxacina.

CUADRO V

Cuando se administran conjuntamente derivados quinolónicos y antiácidos cuya composición química incluye iones Mg^{2+} y Al^{3+} , se produce una disminución importante en el grado de absorción (30, 31), posiblemente como consecuencia de la formación de complejos en los que intervienen los grupos carbonilo y carboxilo, presentes en todas las quinolonas. Esta interacción había sido ya descrita para el ácido nalidíxico comprobándose además que estos compuestos pierden actividad en presencia de cationes inorgánicos (32). Tal como se detalla en el CUADRO VI, los niveles séricos y el grado de excreción urinaria de ciprofloxacina y ofloxacina disminuyen significativamente cuando el antiácido administrado conjuntamente es el hidróxido magnésico o aluminio y no se modifica en absoluto cuando el antiácido asociado es ranitidina o pirenicipina, por lo que se descarta la posibilidad de que sea la variación de pH la causa de esta modificación en la absorción. El descenso observado en el porcentaje de dosis excretado en orina refleja la disminución de la fracción de dosis absorbida como consecuencia, posiblemente, de la formación de complejos no absorbibles.

		Ciprofloxacina	Ofloxacina
	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	1.9	2.2
	excreción e.o.	24%	74%
Con antiácido (Al^{3+} , Mg^{2+})	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0.1	0.5
	excreción e.o.	2.1%	26%
Con ranitidina	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	2.1	2.2
	excreción e.o.	29%	76%

excreción e.o. = excreción en orina

Interacción quinolonas-antiácidos

CUADRO VI

1.3.2. DISTRIBUCION

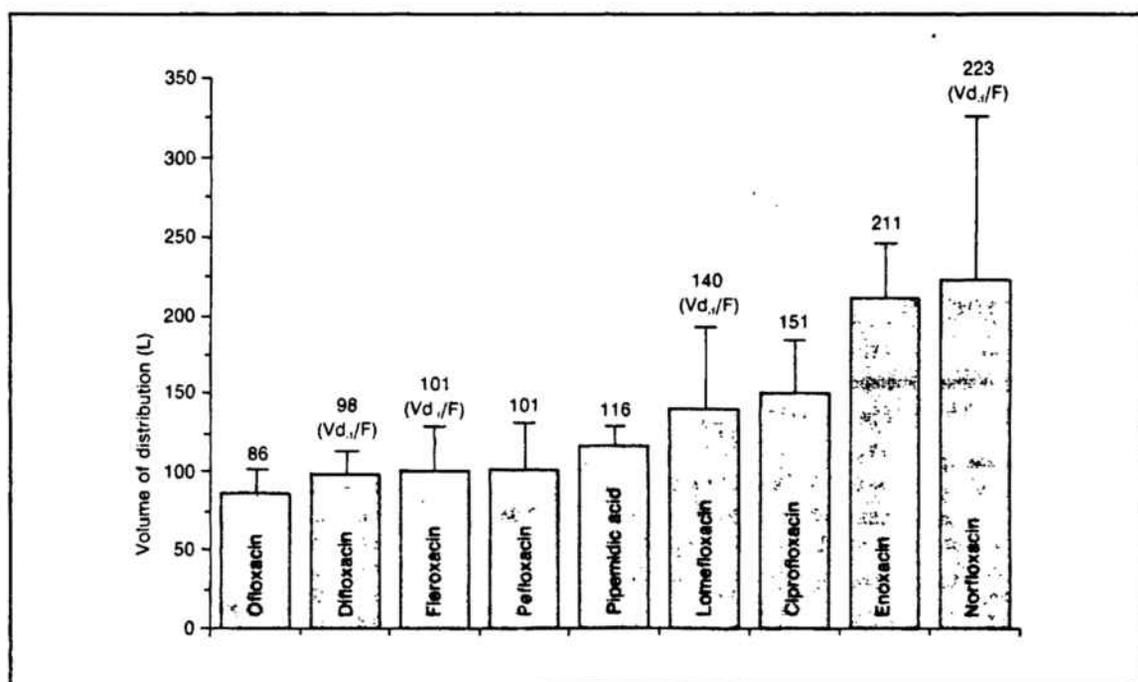
Todas las quinolonas estudiadas parecen distribuirse ampliamente en los diferentes órganos y tejidos del organismo, presentando un valor del volumen de distribución superior al volumen corporal total. Así, por ejemplo, las quinolonas presentan volúmenes aparentes de distribución de 9 a 110 litros, en comparación a los que corresponden a beta-lactámicos y aminoglucósidos que son de 25 litros de promedio. Las concentraciones de las quinolonas en el líquido de una vesícula inducida experimentalmente (fluido "blister"), que se considera fluido intersticial hístico, equivalen a las concentraciones séricas que surgen transcurridas dos horas de la administración oral de estos antibacterianos. La ofloxacina accede más lentamente a este compartimiento (18), manteniendo durante más tiempo los niveles alcanzados; un resumen del porcentaje de penetración de las quinolonas en fluido blister se expone en el CUADRO VII (23). Un estudio comparativo del volumen aparente de distribución de las fluoquinolonas se representa en la FIGURA 3.

	C_{max} plasma/ C_{max} fluido	$\text{ABC}_{\text{plasma}}/\text{ABC}_{\text{fluido}}$
Enoxacina	81%	---
Norfloxacina	67%	106%
Ciprofloxacina	57%	116%
Ofloxacina	57%	125%

Porcentaje de penetración a fluido **blister**.

CUADRO VII

Las concentraciones en pulmones, hígado, corazón, hueso y próstata, después de la administración de una dosis usual, son superiores a las concentraciones inhibitorias de muchas Enterobacteriaceae, Hemophilus, Neisseria y Staphylococcus, pero están por debajo de las concentraciones mínimas de muchos estreptococos hemolíticos y S. pneumoniae. La ciprofloxacina y ofloxacina son eficaces contra algunas cepas y producen siempre concentraciones tisulares altas que inhiben a P. aeruginosa aisladas.



Volumen de distribución (V_{dB}) de las quinolonas.

FIGURA 3

De particular interés son las concentraciones elevadas de quinolonas que se logran en secreciones salivares, mucosas nasales y epitelio bronquial. Estos antimicrobianos penetran en los macrófagos alveolares y en los polimorfonucleares, y destruyen las bacterias intracelulares en tales situaciones. Se han detectado en líquido cefalorraquídeo de sujetos con meningitis, ciprofloxacina, ofloxacina y pefloxacina. En términos generales, las concentraciones han sido menores de $0.5 \mu\text{g/ml}$ para la ciprofloxacina, $4 \mu\text{g/ml}$ para la pefloxacina y, $2 \mu\text{g/ml}$ para la ofloxacina (33, 34, 35). Estas concentraciones inhibían Hemophilus, Neisseria y muchas Enterobacteriaceae, pero serían inadecuadas frente a S. pneumoniae y casi todas las cepas de P. aeruginosa.

En general, el porcentaje de unión de las fluoquinolonas a las proteínas plasmáticas es bastante baja, en contra de lo que sucede con las quinolonas convencionales. Así, por ejemplo, el ácido nalidíxico se une a las proteínas plasmáticas un 93% -fenómeno responsable de interacciones farmacocinéticas con distintos fármacos- y las fluoquinolonas no supera, en general, el 25% (la excepción la constituye la amifloxacina, con un 50%) y en algunos casos apenas llega al 15% (norfloxacin). El porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas posee una relevante importancia terapéutica, ya que sólo la fracción plasmática libre (no unida a las proteínas plasmáticas) es capaz de actuar farmacológicamente y ser distribuida por los tejidos, amén de ser introducida a través de la pared y membrana bacteriana. De ahí que los elevados niveles plasmáticos alcanzados por el ácido nalidíxico sirvan de bien poco en el plano terapéutico: sólo la décima parte de esta concentración plasmática es útil farmacológicamente. En el CUADRO VIII, se consignan los valores del porcentaje de unión a las proteínas de distintas quinolonas (22).

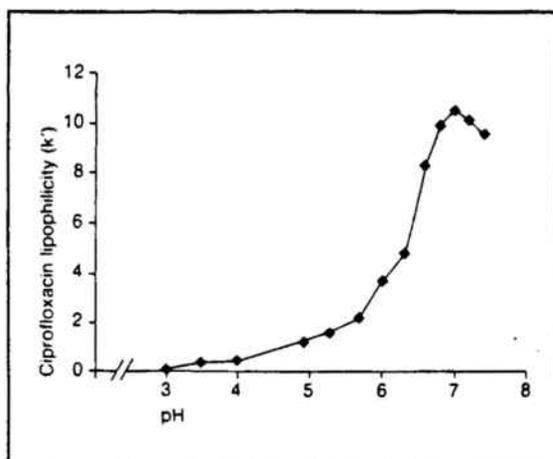
Fármaco	Unión a proteínas (%)
Ciprofloxacina	39.6
Difloxacina	42
Enoxacina	51.2 ± 10.6
Fleroxacina	23.0 ± 1.0
Norfloxacin	14
Ofloxacina	25.0 ± 5.7
Pefloxacina	20-30
Ac. pipemídico	15-39

Unión a las proteínas plasmáticas de distintas quinolonas.

CUADRO VIII

Los estudios realizados mediante cromatografía líquida de alta resolución ponen de manifiesto que la lipofilia de las quinolonas es alta a pH neutro, tal como se expone en la FIGURA 4 (36), por este motivo se sugiere que al ser el pH sanguíneo de 7.4 facilita el paso de estos compuestos a través de las membranas capilares. Al ser la lipofilia de estos fármacos dependientes del pH, este fenómeno puede ser la causa del efecto "ion-trapping" que sufren las quinolonas en los fluidos y tejidos orgánicos con pH ligeramente ácidos o básicos (por ejemplo, en los tejidos inflamados) debido a que las moléculas de estos fármacos están más ionizadas en estos compartimientos y reducen el retorno del fármaco a la circulación sistémica. Por este motivo las concentraciones de estos fármacos en los tejidos son más altas que las que se encuen-

tran en el plasma. En resumen, puede concretarse que, la baja unión a las proteínas plasmáticas, la alta lipofilia que poseen estos fármacos al pH plasmático y el relativo pequeño tamaño molecular de los mismos son los factores mayoritarios que influyen en la distribución de las quinolonas.



Lipofilia de la ciprofloxacina (k') en función del pH.

FIGURA 4

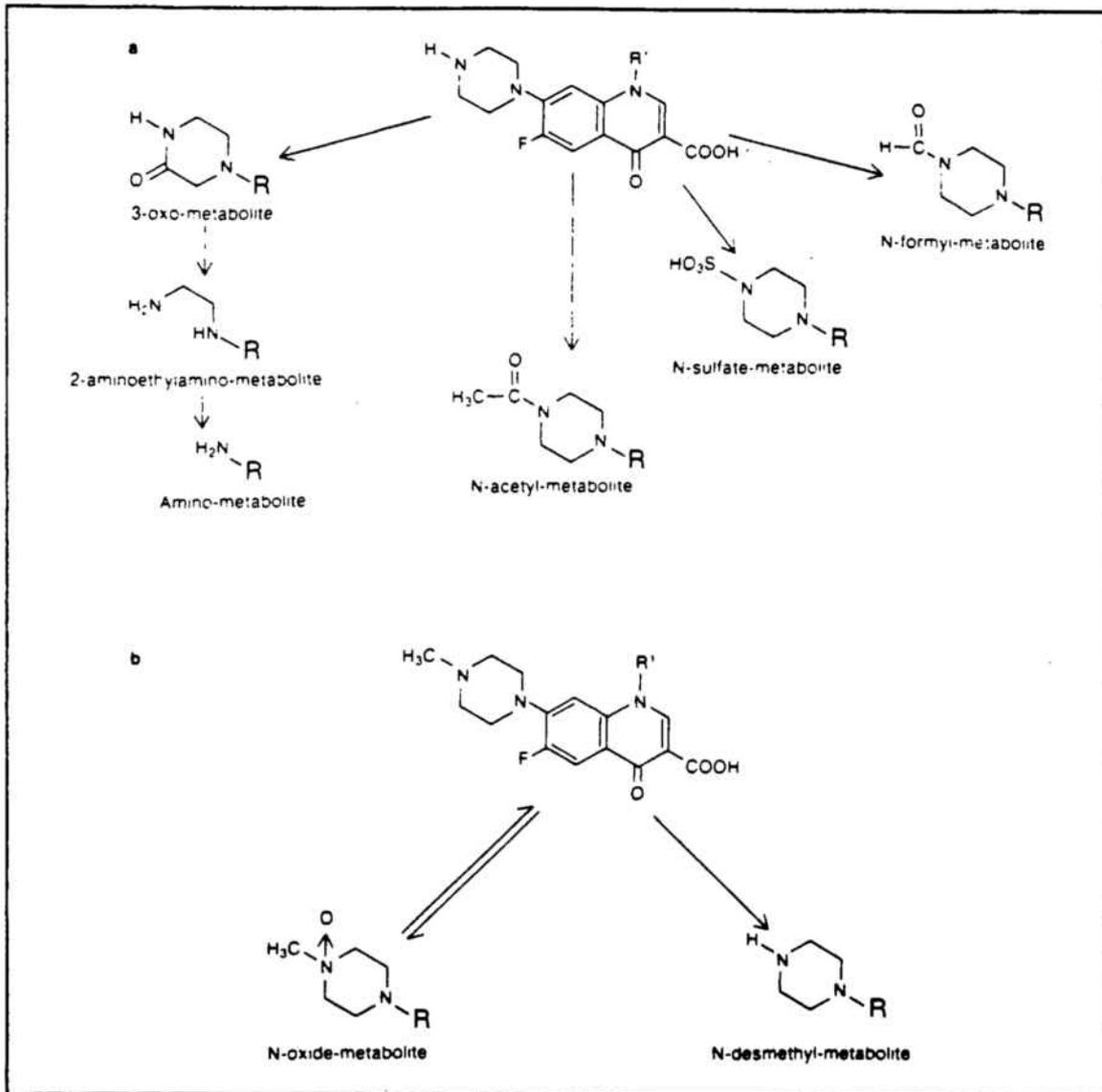
1.3.3. METABOLISMO

Respecto al metabolismo de estos fármacos, se puede afirmar que todas las quinolonas sufren un proceso de biotransformación hepático. Sin embargo, el grado de metabolismo hepático difiere grandemente entre uno y otro derivado.

Las quinolonas pueden experimentar diferentes reacciones metabólicas como glucuronidación, hidroxilación y oxidación, según el compuesto participante (37). Las principales vías metabólicas de las quinolonas se detallan en la FIGURA 5. La mayoría de los procesos metabólicos afectan al anillo piperacínico de la posición 7. Concretamente, en los derivados N-metilados (amifloxacina, ofloxacina y pefloxacina), la primera modificación suele consistir en una N-desmetilación, lo cual no hace perder significativamente la actividad antibacteriana. A continuación suele producirse el derivado N-oxidado. En términos generales, los metabolitos poseen menor actividad antibacteriana que los compuestos de origen. Los derivados oxo y formilo tienen la máxima actividad, en tanto que los N-óxido y los glucurónidos son inactivos (38). La ciprofloxacina, enoxacina, fleroxacina y norfloxacina se encuentran en forma de metabolitos entre un 10 y 23% en orina (37). La ofloxacina se metaboliza en pequeña proporción, un

3%, sin embargo, la pefloxacin es excretada en forma de metabolitos en un 60%.

Para la norfloxacin se han identificado cinco metabolitos siendo el mayoritario el oxometabolito que equivale al 50% del total de los metabolitos, el cual posee sólo un 10% de la actividad antibacteriana respecto al fármaco original. El segundo metabolito en importancia de la norfloxacin es el derivado etilendiamina.



R = núcleo; R' = alquil, fluoroalquil, fluorofenil, ciclopropil.

Principales vías metabólicas de las quinolonas.

FIGURA 5

La enoxacina presenta cuatro metabolitos: oxoamino, formil y acetilcompuestos. El mayoritario es el oxo-enoxacin, el cual es de 10 a 20 veces menos activo que el fármaco original. También para pefloxacina se han identificado cuatro metabolitos: el desmetilmetabolito, el N-óxido, el oxodesmetilmetabolito y el oxopefloxacilmetabolito. El metabolito mayoritario de la pefloxacina, como en el caso de la norfloxacin es el N-óxido metabolito, que también posee menor actividad antibacteriana. Tras la administración oral de la pefloxacin, este fármaco no sufre efecto de primer paso hepático. La ofloxacin, lo mismo que la lomefloxacin, no genera metabolitos, a diferencia de las otras quinolonas, excepto los producidos por glucoconjugación. Dos metabolitos, en este sentido, han sido bien identificados en orina (desmetil y N-óxido) pero no representan menos del 5% de la dosis administrada.

Respecto a la ciprofloxacina, cuando se administra por vía oral aproximadamente el 30% de fármaco es excretado sin metabolizar, sin embargo, cuando el antiinfeccioso se administra por vía intravenosa se encuentra en orina aproximadamente el 57.4% de fármaco. Este hecho pone de manifiesto el efecto de primer paso hepático que sufre la ciprofloxacina tras su administración oral. Los cuatro metabolitos identificados de la ciprofloxacina son los derivados desmetilén, sulfo, oxo y formilo, siendo la oxociprofloxacina el metabolito mayoritario que está provisto aproximadamente de un 10% del efecto terapéutico respecto a su precursor (39, 40).

El metabolito mayoritario de la amifloxacina es el piperacilin-N-desmetil compuesto el cual, al igual que en el caso de las otras quinolonas, posee una actividad antimicrobiana considerablemente menor que en el compuesto original (41).

Las quinolonas pueden inhibir el metabolismo de otros fármacos, el ejemplo más relevante por sus implicaciones clínicas es la inhibición del metabolismo de la teofilina por parte de la enoxacina. La influencia de la interacción quinolonas-teofilina en los parámetros farmacocinéticos del broncodilatador se expone en el CUADRO IX. También la enoxacina interacciona con la cafeína y la antipirina. Por otra parte, la cimetidina interacciona a nivel de metabolismo con la pefloxacin (42, 44).

Finalmente, respecto al metabolismo de estos fármacos, comentar, que los metabolitos de las quinolonas no se acumulan en cantidades importantes en los tejidos corporales y poseen una semivida biológica semejante a los compuestos de origen, siendo el metabolismo un proceso que disminuye la actividad farmacológica de estos antiinfecciosos.

	T _{1/2} (horas)	CL(ml/min)	CL _R (ml/min)
Control	5.9(2.5)	85.9(33.4)	7.6(1.5)
Enoxacina	15.3(5.3)	31.3(7.8)	7.2(1.8)
Pefloxacina	8.6(3.6)	60.6(23.8)	7.5(1.7)
Ciprofloxacina	8.4(2.4)	59.8(27.4)	7.0(1.6)
Ofloxacina	6.0(2.1)	81.5(31.1)	6.6(1.0)
Ac. nalidíxico	5.7(2.3)	82.4(15.9)	8.0(2.7)

*Parámetros farmacocinéticos de teofilina administrada sola (control) y conjuntamente con diferentes quinolonas. Parámetros medios (desviación estándar).

Interacción quinolonas-teofilina*.

CUADRO IX

1.3.4. EXCRECION

Las quinolonas son excretadas a nivel renal, que junto con el metabolismo hepático y una probable secreción gastrointestinal constituyen el proceso de eliminación de estos fármacos. Como en la mayoría de los fármacos, el régimen usual de dosificación de las quinolonas se basa en el valor de la semivida biológica de las mismas, valor que depende del proceso de eliminación (metabolismo más excreción). De acuerdo con el valor de la semivida biológica de las quinolonas pueden clasificarse en cinco grupos tal como se expone en el CUADRO X (43, 45). Debe hacerse constar que la eliminación de las quinolonas depende en buena parte de la biodisponibilidad oral del fármaco y de su tasa de biotransformación. Así, norfloxacina y ciprofloxacina, con una baja tasa de absorción oral, presentan un relativamente alto porcentaje de eliminación fecal (20-30%), mientras que la ofloxacina es excretada por la orina de forma inalterada, en más de un 80%. Dada la extraordinaria potencia de estos compuestos, las diferencias en cuanto a las vías de eliminación y las concentraciones activas alcanzadas en las mismas, no suelen tener transcendencia terapéutica.

Puede concretarse que la excreción renal es la vía más importante de eliminación de las quinolonas y sus metabolitos. Así, la ciprofloxacina, enoxacina, fleroxacina, lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina y temafloxacina son excretadas en elevada proporción sin metabolizar. Sin embargo, la pefloxacina se excreta como tal solamente un 7.6% de la dosis administrada y la difloxacina el 9.6% (46, 47). Como consecuencia del relativo bajo peso molecular de estos fármacos y su escaso porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas, tanto de las quinolonas como de sus metabolitos, la excreción

de estas sustancias a nivel renal, se realiza mayoritariamente por filtración glomerular. No obstante, el elevado valor del aclaramiento renal de estos fármacos, respecto a la velocidad de filtración glomerular que poseen (80-120 ml/min), sugiere un proceso adicional de excreción por secreción tubular. Sin embargo, el valor del aclaramiento renal de estas sustancias, considerado en valor absoluto, es decir, filtración glomerular y secreción tubular, es bajo; hecho que permite considerar la presencia en la excreción de las quinolonas de un proceso de reabsorción tubular activa (43, 46, 47).

$t_{1/2}$ (h)	Quinolonas
< 4	Ciprofloxacina Ac. pipemídico
4 - 6	Enoxacina Norfloxacina Ofloxacina
6 - 8	Lomefloxacina Temafloxacina
9 - 11	Fleroxacina Pefloxacina
> 25	Difloxacina

Semivida biológica de diferentes quinolonas.

CUADRO X

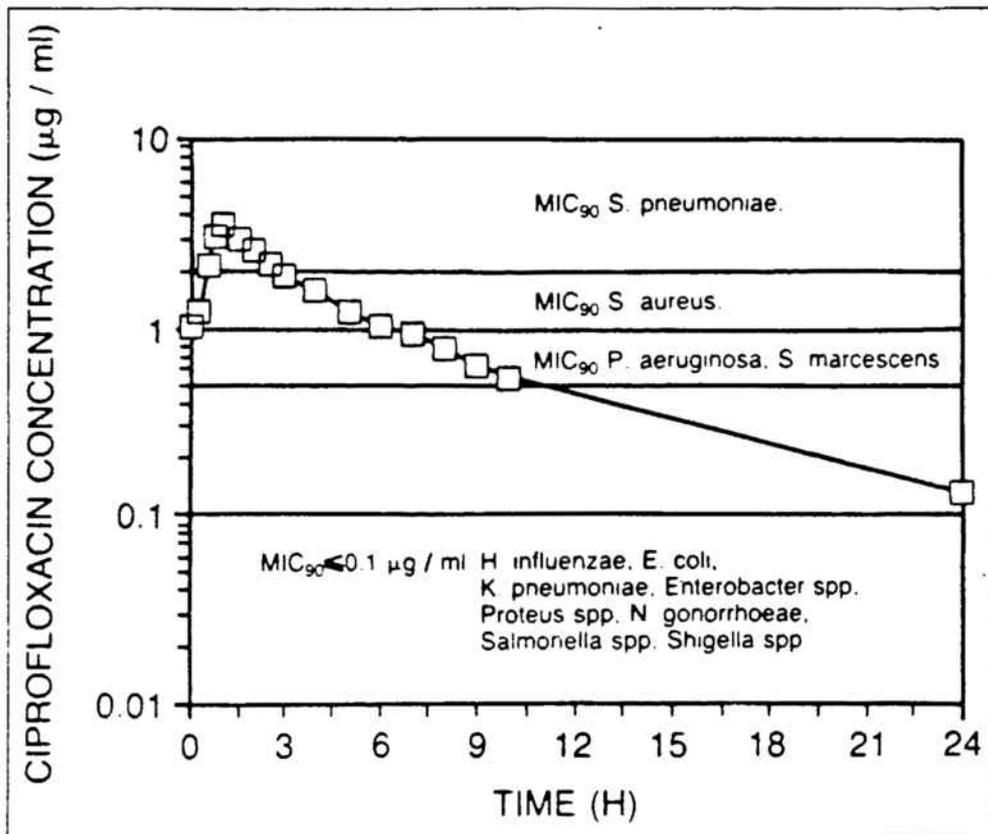
Los valores del aclaramiento renal de los metabolitos de las quinolonas es más alto que el correspondiente a las sustancias de origen, lo que permite sugerir que los metabolitos poseen una mayor secreción y una menor reabsorción respecto a sus predecesores. Cabe comentar, finalmente, que en presencia de una función renal disminuída, se observa un incremento mínimo en la semivida de la norfloxacina y pefloxacina; incremento leve de la semivida de la ciprofloxacina y un notable incremento de este parámetro en la oxofloxacina (49). La hemodiálisis y la diálisis peritoneal disminuyen la semivida de las quinolonas, por ejemplo, la semivida de la ciprofloxacina disminuye de 12 a 5 horas durante la hemodiálisis y a 7 horas durante la diálisis peritoneal, siendo su aclaramiento de 2.42 a 0.18 l/h (50) en hemodiálisis y de 2.1 a 3.6 l/h en diálisis peritoneal. En estos casos es recomendable monitorizar las quinolonas.

La vía biliar también contribuye parcialmente a la eliminación de algunas quinolonas, concretamente pefloxacina, ciprofloxacina y norfloxacina utilizan esta vía, alcanzándose concentraciones en bilis del orden de 5-30 $\mu\text{g/ml}$ (38). Las concentraciones de las quinolonas en bilis son altas respecto a las que se alcanzan en plasma, concretamente de 2 a 10 veces más altas (51).

A nivel de la excreción se han encontrado interacciones de las quinolonas en la secreción tubular, proceso que es inhibido por el probenecid (52).

1.3.5. REGIMENES DE DOSIFICACION

Para determinar el intervalo de dosificación óptimo de las quinolonas, debe tenerse en cuenta el tiempo que sus concentraciones plasmáticas se mantienen por encima del valor MIC_{90} (concentración mínima inhibitoria para el 90% de las cepas patógenas). Así, por ejemplo, en la FIGURA 6, se exponen las concentraciones plasmáticas de ciprofloxacina representativas de un bucle en estado de equilibrio estacionario consecutivamente a una administración oral de 500 mg cada ocho horas en relación con los valores MIC_{90} para las bacterias tratadas. De acuerdo con esta experiencia, se puede concretar que un régimen posológico de 500 mg de ciprofloxacina cada 12 horas sería adecuado para el tratamiento de infecciones producidas por estas bacterias. Algunos autores, sin embargo, sugieren dosis más altas o intervalos más cortos en el tratamiento de infecciones sistémicas producidas por gérmenes resistentes (Staphilococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa) (53).



Curva de concentraciones plasmáticas-tiempo de ciprofloxacina (500 mg cada cada 8 h, 13 dosis) con valores de MIC₉₀ para diversas bacterias.

FIGURA 6

Un resumen de las principales características farmacocinéticas de las quinolonas se expone en el CUADRO XI (19).

Quinolona (dosis oral)

Parámetro	Ac.Nali- dixico (1000 mg)	Cipro- floxacina (500 mg)	Eno- xacina (400 mg)	Flero- xacina (400 mg)	Nor- floxacina (400 mg)	Oflo- xacina (400 mg)	Pe- floxacina (400 mg)
Biodisponibilidad absoluta	(100%)	65-85%	90%	100%	(30-40%)	95-100%	100%
C_{max} , $\mu\text{g/ml}$	15-30	2.0-2.8	2.4-3.0	4.2-6.1	1.5-2.0	3.5-5.6	3.8-6.6
T_{max} , h	1.5	1.2	1.5	1.1	1.5	1.2	1.2
Unión a proteínas plasmáticas, %	93	20-40	32	23	14	10-20	20-30
Volumen distribución, l/kg	0.5	3.0	2.5	1.4	1.5	1.5	1.8
Metabolismo							
Nº de metabolitos (activos)	4(1)	3(3)	1(1)	2(1)	6(3)	2(1)	3(1)
% de dosis oral	90	19	10-15	10	23	3	60
Semivida($t_{1/2\beta}$), h	3-8	3-5	4.5-7	9-13	3.5-5.5	5-8	9-12
Aclaramiento total ml/min	50	400-700	450-600	90-140	400	230-290	120-150
Aclaramiento renal ml/min	--	300	200-300	50-80	285	185-245	7.5
Vía de eliminación, % de dosis oral	96	40-60	45-55	50-65	30-40	70-80	10-50
Renal	4	30	18	10	29	5-10	?
Gastrointestinal							

Los paréntesis indican biodisponibilidad relativa, por no ser posible la formulación intravenosa.
 Parámetros farmacocinéticos comparativos de distintas quinolonas.
 CUADRO XI

1.4. CONSIDERACIONES CLINICAS

1.4.1. INFECCIONES DE LAS VIAS URINARIAS

Las nuevas quinolonas son agentes excelentes para tratar infecciones específicas de vías urinarias porque inhiben Enterobacteriaceae y P. aeruginosa, incluidos microorganismos resistentes a betalactámicos, aminoglucósidos y trimetoprim (CUADRO XII) (54, 55). Las concentraciones en orina aminoran el riesgo de resistencia espontánea, y las que se alcanzan en intestino eliminan a uropatógenos potenciales y así disminuye la posibilidad de reinfección o infección sobreañadida en el individuo inválido en cama u hospitalizado. Aparecen niveles inhibitorios adecuados en orina, incluso si la función renal ha disminuído en forma extraordinaria.

Entidades patológicas	
<i>Infecciones de vías respiratorias</i>	
Faringitis	No apropiada
Otitis media	No apropiada
Otitis necrosante	Ciprofloxacina contra <i>P. aeruginosa</i>
Sinusitis	Contra Hemophilus
Bronquitis bacteriana	Ciprofloxacina u ofloxacina
Neumonía extrahospitalaria	Rara vez apropiada
Neumonía por aspiración extrahospitalaria	No apropiada
nosocomial	Ciprofloxacina u ofloxacina
Fibrosis quística	Ciprofloxacina
<i>Infecciones de vías urinarias</i>	
Cistitis	Eficaces, pero otros agentes son de primera línea
Pielonefritis	Todos son eficaces
Prostatitis nosocomial	Todos son eficaces
<i>Infecciones de estructuras cutáneas</i>	
Piodermia	No son apropiadas
Ulceras por decúbito	Ciprofloxacina, ofloxacina
<i>Osteomielitis</i>	
Hematógena en niños	No apropiados
Infecciones crónicas	Ciprofloxacina, ofloxacina y a veces norfloxacina
<i>Diarreas</i>	
	Todas son eficaces
<i>Enfermedades venéreas</i>	
Gonorrea	Norfloxacina, ofloxacina, ciprofloxacina
Chlamydia	Ofloxacina o ciprofloxacina
Chancroide	Todas son eficaces
Mycoplasma	Ofloxacina o ciprofloxacina
Sífilis	No son apropiadas

Empleo clínico de las quinolonas.

CUADRO XII

Las quinolonas no constituyen los agentes de primera línea para combatir la cistitis simple y en estos casos conviene usar otros productos. Existe mayor posibilidad de que norfloxacin, ciprofloxacina u ofloxacina sean más eficaces que dosis únicas de amoxicilina o trimetoprim-sulfametoxazol (TMP/SMX) en el tratamiento del individuo con síntomas que han persistido por más de 48 horas o en sujetos con cistitis hemorrágica. Entre los padecimientos para emplear con ventaja las nuevas quinolonas (54, 56, 57), están las infecciones nosocomiales de vías urinarias, pielonefritis (enfermedades de porción superior de las vías urinarias) y las infecciones complicadas de dichas vías.

Las quinolonas no deben usarse con fines profilácticos en varones ancianos con lesiones renales obstructivas, o en forma crónica en sujetos con calculopatías renales, porque en estas situaciones surge rápidamente resistencia. Hay que cambiar las sondas vesicales a permanencia y recurrir a cateterismo directo intermitente, para evitar que surjan problemas de resistencia.

Las quinolonas son eficaces para combatir la prostatitis aguda, que es causada más bien por Escherichia coli. Hay pruebas preliminares de que la ciprofloxacina curará la prostatitis crónica por E. coli pero se advierten recaídas en sujetos infectados por P. aeruginosa o enterococos (58). Cabe probar las quinolonas en cualquier caso de prostatitis porque tienen la misma posibilidad de ser eficaces que los agentes disponibles.

1.4.2. ENFERMEDADES VENEREAS

Todas las quinolonas han sido eficaces en una sola dosis contra la gonorrea, incluidas las cepas de Neisseria gonorrhoeae productoras de penicilinas. Ninguna de las quinolonas actuales son eficaces en una sola dosis contra Chlamydia y tampoco lo son contra tal microorganismo 400 mg de norfloxacin dos veces al día durante 10 días. Con ciprofloxacina se tienen tasas menores de curación de la uretritis por Chlamydia, en comparación con lo que se logra con la doxiciclina (60). Se necesitan más datos sobre la eficacia de las quinolonas en infecciones genitales por micoplasma o ureaplasma (61). Se han utilizado dichos compuestos para combatir el chancroide por H. ducreyi.

1.4.3. INFECCIONES DE LAS VIAS RESPIRATORIAS SUPERIORES

La norfloxacin no se ha aprobado en Estados Unidos para tratar infecciones respiratorias; en caso de *Haemophilus*, generaría niveles adecuados en los senos paranasales, pero no en el caso de otros microorganismos. Se han tratado satisfactoriamente con ciprofloxacina y ofloxacina otitis y sinusitis, pero en opini3n del autor, dichos agentes no constituyen f3rmacos de primera l3nea y como tratamiento inicial son m3s apropiados betalact3micos, macr3lidos o la combinaci3n de trimetoprim con sulfametoxazol. La ciprofloxacina puede utilizarse apropiadamente para tratar otitis externa necrosante del diab3tico causada por *P. aeruginosa*.

1.4.4. INFECCIONES DE LAS VIAS RESPIRATORIAS INFERIORES

En las exacerbaciones agudas de bronquitis que son menos susceptibles a quinolonas, predominan los neumococos. Debe utilizarse un antibi3tico betalact3mico si en el frotis de esputo se detectan diplococos grampositivos, pero si en la tinci3n de Gram se advierte un predominio de cocobacilos gramnegativos, que indican *H. influenzae* o *B. catarrhalis*, o si se han administrado ampicilina, amoxicilina o eritromicina y se ha fracasado, opciones razonables ser3an ciprofloxacina y ofloxacina (62, 63, 64).

La neumon3a debe dividirse en infecciones extranocomiales y nosocomiales. Ciprofloxacina y ofloxacina son alternativas para usar en vez de los betalact3micos, pero otros agentes deben ser los de primera l3nea, en especial si el pat3geno m3s probable es *S. pneumoniae*. La neumonitis por aspiraci3n, en la comunidad, es causada por la flora de anaerobios y microaer3filos de la boca, concretamente estreptococos microaer3filos, *Bacteroides melaninogenicus* y especies de *Fusobacterium*; las quinolonas no son agentes apropiados contra dichas infecciones. Sin embargo, en los hospitales en que pat3genos importantes son algunos aerobios gramnegativos como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*, pueden utilizarse inicialmente quinolonas dentro de un plan de control, o como agente ingerible (65, 66, 67).

1.4.5. FIBROSIS QUISTICA

El tratamiento de la fibrosis qu3stica con quinolonas debe limitarse a ciprofloxacina en sujetos de m3s de 14 a3os de edad. El empleo de dicha quinolona por m3s de dos a cuatro semanas no ha incrementado la mejor3a cl3nica y ha ocasionado una "selecci3n" de microorganismos resistentes

(68). La ciprofloxacina debe alternarse con otros agentes como penicilinas antiseudomonas, ceftacidima o aztreonam, o en combinación con tales antibióticos si se demuestra sinergia. La quinolona mencionada no debe usarse por largo plazo, porque hará que surja rápidamente resistencia en algunas bacterias.

1.4.6. DIARREAS

Norfloxacin, ciprofloxacina u ofloxacina curarán la diarrea por *Shigella*; por *E. coli* toxígena; por *Salmonella* incluida *S. typhi*; por *Campylobacter*; *Aeromonas*, *Vibrio parahemolyticus* y *Vibrio cholerae* (69). La elevada concentración intraluminal de estos fármacos y las excelentes concentraciones en tejidos, macrófagos y mucosa intestinal constituyen aspectos importantes que contribuyen a la erradicación de bacterias patógenas intestinales en menos de 48 horas. Los elevados niveles del fármaco en intestino aminoran el peligro de que surja resistencia, y su falta de actividad contra *Bacteroides*, especies de *Clostridium* y estreptococos, aminora el peligro de síndromes de proliferación bacteriana excesiva. Sin embargo, no inhibe *C. difficile*, y rara vez ha causado colitis. Norfloxacina y ciprofloxacina al parecer son eficaces en el estado portador de tifoidea (70).

1.4.7. INFECCIONES DE ESTRUCTURAS CUTANEAS

La norfloxacina y otras nuevas quinolonas no deben usarse en piodermia causada por estreptococos y en infecciones cutáneas por estafilococos, y los agentes de primera línea seguirían siendo los betalactámicos. Sin embargo, las nuevas quinolonas, en particular ofloxacina y ciprofloxacina, son apropiadas en casos escogidos. Incluso, la norfloxacina constituye una forma alternativa de tratamiento. En infecciones mixtas por gramnegativos aerobios durante la hospitalización, como en úlceras por decúbito, es posible que el paciente retorne a su hogar o a una especie de anexo para situaciones intermedias, mientras sigue recibiendo una quinolona oral. Incluso si la concentración inhibitoria mínima de estafilococos y de *P. aeruginosa* ha aumentado durante el tratamiento de las infecciones cutáneas, ello no obligadamente ocasionará fracaso clínico (71).

1.4.8. OSTEOMIELITIS

La osteomielitis por infección continua o la que surge después de traumatismo o cirugía es una situación en que se puede utilizar una quinolona porque permite el tratamiento en el hogar por períodos más duraderos (72). Se han logrado con ciprofloxacina y ofloxacina resultados clínicos mejores que con el tratamiento parenteral, y dichos agentes han sido útiles para combatir las infecciones de esternotomía causadas por S. epidermidis, S. aureus resistentes a meticilina y bacterias gramnegativas como Serratia y P. aeruginosa.

Las quinolonas, en particular ofloxacina y ciprofloxacina, inhiben algunas especies de micobacterias atípicas que causan infección de piel y de huesos (73). Se necesitan más estudios para saber si estos agentes tendrán utilidad clínica.

1.4.9. OTRAS INDICACIONES CLINICAS

Otro uso posible e interesante de las quinolonas sería el tratamiento de la gastritis antral de tipo B por Campylobacter pyloridis. Al parecer, algunos de estos compuestos pueden excretarse por la mucosa gástrica. Las quinolonas poseen características que les permiten penetrar en la capa de moco gástrico en la que vive Campylobacter. Se necesitan estudios a largo plazo para conocer el porcentaje final de recaída en la gastritis por Campylobacter, cuando el sujeto recibe una quinolona, porque se han observado fracasos con ofloxacina.

1.4.10. EMPLEO PROFILACTICO DE LAS QUINOLONAS

Ciprofloxacina ha sido eficaz para eliminar el estado de portador en vías nasales de S. aureus resistente a meticilina, en sujetos hospitalizados y en personal del nosocomio. El hecho de portar Neisseria meningitidis en vías nasales y faringe puede eliminarse con ciprofloxacina. En este sentido, no se cuenta con estudios de otras quinolonas.

Uno de los aspectos más interesantes del empleo profiláctico de quinolonas será el de sujetos neutropénicos que recibirán quimioterapia o después de transplante de médula ósea (74). Con ellas, el contenido fecal de estafilococos y enterococos disminuye en forma mínima, en tanto que no se altera la flora de anaerobios. ¿Aparecerán bacterias resistentes? Los pacientes con fibrosis quística que presentaron resistencia de Pseudomonas en su esputo, no mostraron microorganismos resistentes en su flora fecal. Se necesitan más

estudios para saber exactamente en qué pueden utilizarse con gran provecho las quinolonas en sujetos neutropénicos.

1.4.11. EFFECTOS ADVERSOS

En términos generales, norfloxacin, ciprofloxacina y ofloxacina han sido toleradas en forma extraordinariamente satisfactoria, y sólo 5 a 10% de los pacientes han tenido reacciones adversas menores (75). El efecto adverso más común se ha localizado en vías gastrointestinales. Con todos los agentes un fenómeno siempre presente es la náusea, que afecta 1 a 5% de los individuos que las reciben y que aparece con mayor frecuencia con grandes dosis. Otros efectos gastrointestinales incluyen dolor abdominal, emesis y diarrea. Ha ocurrido colitis pseudomembranosa, pero es rara.

Los efectos adversos más frecuentes en el sistema nervioso central son mareo, cefalalgia, inquietud, depresión, insomnio y somnolencia. En pacientes que recibían enoxacina y teofilina (75) se han observado convulsiones.

La toxicidad en riñones no ha constituido un problema, aunque ha habido cristaluria en quienes recibieron 800 ó 1600 mg de norfloxacin, y es un fenómeno raro con la ciprofloxacina. No hay signos de que la cristaluria ocasione toxicidad renal. No se ha señalado toxicidad en ojos entre quienes reciben norfloxacin, ofloxacina o ciprofloxacina, incluso cuando se hayan administrado los agentes por largo tiempo. Algunas quinolonas producen cataratas en animales, después de empleo duradero. Con todos estos compuestos se han señalado reacciones de fotosensibilidad cutánea, que han sido raras después de usar norfloxacin o ciprofloxacina. También son poco comunes eosinofilia, fiebre o urticaria, pero se observan como ocurrirían con cualquier tipo de fármacos.

Las quinolonas administradas durante largo tiempo, a perros inmaduros, en dosis seis veces mayores de las comunes para los humanos, producen erosiones del cartílago de articulaciones que soportan pesos y daño permanente en ellas. Con todas las quinolonas se han señalado casos ocasionales de altralgia, pero ha sido transitoria y no ha producido problemas articulares permanentes en adultos. La preocupación por el posible daño articular es la razón por la que no se recomienda el uso de quinolonas para combatir infecciones en niños. Sin embargo, 100 niños con fibrosis quística han recibido ciprofloxacina, sin presentar problemas articulares.

Las anormalidades de las pruebas de funcionamiento hepático o de estudios hematológicos son poco comunes. Como ocurre con otros agentes, pacientes ocasionales muestran elevaciones del nivel de transaminasas, y neutropenia, anorma-

lidades que cedieron cuando se interrumpió el uso de quinolonas.

Entre las interacciones farmacológicas importantes de las quinolonas están interferencia en la absorción, cuando los fármacos se ingieren junto con antiácidos a base de magnesio o aluminio, y elevación de los niveles séricos de teofilina causados por una menor eliminación del producto, cuando se utilizó enoxacina (76). No existe el problema de niveles tóxicos de teofilina en lo que se refiere a ofloxacina o norfloxacina, pero los niveles de dicho fármaco deben vigilarse cuando se administra ciprofloxacina, si se usan simultáneamente.

CAPITULO 2º

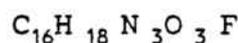
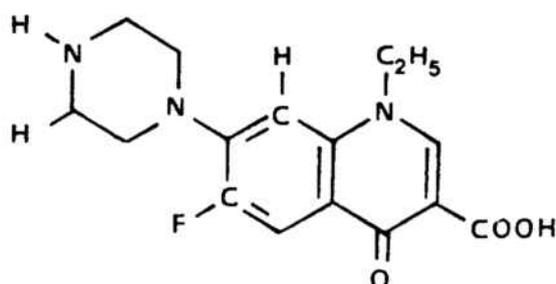
2. MATERIALES Y METODO

2.1. CALCULO DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ABSORCION.

2.1.1. COMPUESTOS ENSAYADOS.

Los fármacos estudiados en el presente trabajo corresponden a una serie de quinolonas, fármacos antibacterianos de amplio espectro, concretamente cinco fluoquinolonas, cuyas características químicas más relevantes se detallan a continuación.

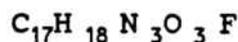
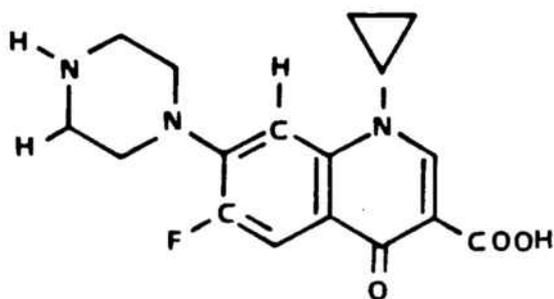
NORFLOXACINA



PM 319.31

Soluble a pH = 6.2 - 6.9

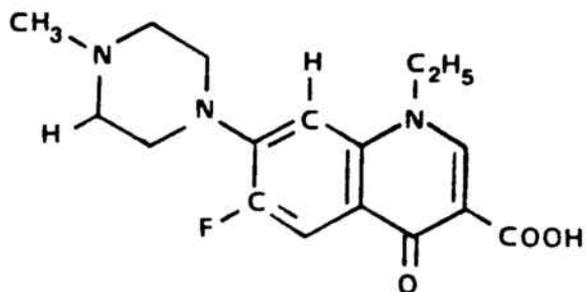
CIPROFLOXACINA



PM 331.35

Soluble a pH = 5.5 - 5.6

PEFLOXACINA

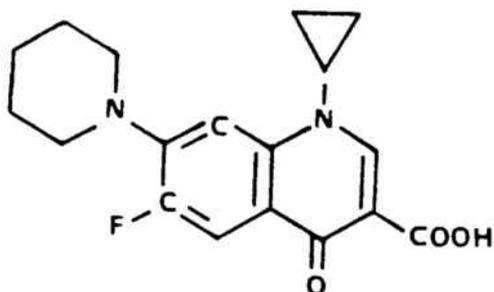


$C_{17}H_{20}N_3O_3F$

PM 333

Soluble a pH = 5.6 - 6

CNV 8804 (*)

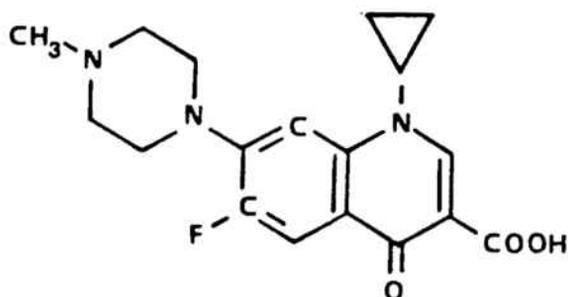


$C_{18}H_{19}N_2O_3F$

PM 330.14

Soluble en soluciones alcalinas; no forma el clorhidrato; es el producto más lipófilo de la serie de piperacinas.

(*) Sintetizadas por Lab. CENAVISA S.A. Reus (Tarragona).



$C_{18}H_{20}N_3O_3F$

PM 345

Soluble en álcalis.

Estas dos últimas fluoquinolonas no han sido, hasta el momento, comercializadas.

2.1.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se han utilizado ratas albinas hembras de la raza Wistar, de pesos comprendidos entre 160 y 300 g procedentes del estabulario de nuestra Facultad.

Para el estudio de la constante de velocidad de absorción de los fármacos sometidos a estudio, se dejaron los animales en ayunas durante 18-20 horas antes de proceder a los ensayos, pero se les suministró agua "ad libitum" durante todo este tiempo. Para evitar la coprofagia en el período de ayuno, se les mantuvo alojadas en jaulas de material plástico con fondo de tela metálica ancha.

Para el cálculo de la constante de velocidad de absorción, por el método de perfusión, se han utilizado 5 animales por cada fármaco ensayado.

2.1.3. METODO DE PERFUSION.

El método de perfusión para el cálculo de la constante de velocidad de absorción de las sustancias en general y de los fármacos en particular (77, 78), consiste, en líneas generales, en mantener circulando una solución de fármaco, en condiciones estandarizadas, mediante una bomba peristáltica a través de un circuito cerrado, del cual forma parte el tramo

intestinal del animal de experimentación que permanece anestesiado durante el transcurso de la experiencia.

El trabajo experimental requiere material usual existente en cualquier laboratorio farmacológico y material especial para la puesta a punto de la técnica.

2.1.3.1. Material usual.

- 1.- Pieza base de acero inoxidable.
- 2.- Soportes con pinzas para la sujeción de jeringas.
- 3.- Pinzas para sujeción del animal.
- 4.- Tijeras grandes rectas de punta roma y tijeras pequeñas rectas de punta ligeramente redondeada.
- 5.- Pinzas grandes en diente de ratón y pinzas pequeñas de punta lisa.
- 6.- Hilo resistente de seda o algodón para la sujeción del intestino a las cánulas.
- 7.- Jeringuillas de insulina con y sin aguja.
- 8.- Algodón hidrófilo arrollado.
- 9.- Cronómetro para el control del tiempo durante la experiencia.
- 10.- Probeta graduada de 50 ml tipo A para reservorio de la solución medicamentosa a perfundir.
- 11.- Matraces aforados de 100 ml.
- 12.- Tubos desechables de plástico para la recogida de las muestras.
- 13.- Tubos de ensayo de vidrio de 10 ml de capacidad y con tapón de rosca para la preparación de las muestras.
- 14.- Pipetas automáticas (PIPETMAN, GILSON) de volumen regulable de 1-100 μ l y de 1-5 ml de capacidad. Puntas correspondientes.
- 15.- Cápsula de porcelana para la recogida de los líquidos de lavado en la preparación biológica.
- 16.- Filtros desechables (SARTORIUS) de 0.45 μ m de diámetro de poro para filtrar las muestras.

- 17.- Vasos de precipitados para la preparación de las soluciones tampón.
- 18.- Viales para HPLC, de 1 ml de capacidad, tapones y septums (TEKNOKROMA).
- 19.- Núcleos magnéticos para la agitación de soluciones.

2.1.3.2. Material especial.

- 1.- Dos cánulas preparadas a partir de un tubo de vidrio de 5 mm de diámetro, modeladas al fuego en forma de L. La longitud del brazo vertical debe ser aproximadamente de 5 cm y la del brazo horizontal de 3 cm. El primero de ellos se une a un tubo de polietileno para su adaptación a las llaves de paso y en el segundo se practica una escotadura para que la ligadura con hilo de seda o algodón se realice con seguridad y el intestino no resbale sobre la cánula. El borde de la cánula debe estar bien pulido y no ser cortante ya que podría producir heridas en su roce con las paredes del intestino.
- 2.- Una jeringa especial, con cono metálico adaptable a una llave de tres pasos, de 5 ml de capacidad. En la experiencia se ha utilizado de la marca "Multifit" (BD, Luer-Lock). La jeringa se ha utilizado para las operaciones de lavado del intestino.
- 3.- Una llave de tres pasos "tipo Stopcock" (marca BD-MS-3035) adaptable a la jeringa anteriormente citada. Variando la posición de la llave se obtienen las siguientes conexiones: exterior/jeringa, exterior/lumen y jeringa /lumen. La parte inferior de la llave, mediante presión o giro debe encajar con el tubo de polietileno de la cánula.
- 4.- Tubo de polietileno de 2.5 mm de diámetro interno y 5 mm del externo, para la circulación de la solución medicamentosa a perfundir. Se realiza un circuito que sigue la trayectoria siguiente: reservorio, bomba de perfusión, intestino delgado de la rata y vuelta al reservorio.
- 5.- Cuatro piezas de material plástico para la realización de los empalmes: tubo de perfusión de la bomba-tubo de polietileno del circuito y tubo de polietileno del circuito-tubo de polietileno de las cánulas.

2.1.4. APARATOS AUXILIARES Y DE MEDIDA.

- 1.- Balanza de precisión monoplato SARTORIUS, para la pesada de sustancias.
- 2.- Balanza de hasta 2 kg para el pesaje de las ratas.
- 3.- Agitador magnético ASINCRO en la preparación de la solución de los fármacos ensayados y en la homogenización de la solución medicamentosa que se perfunde.
- 4.- Baño de ultrasonidos SELECTA para la fragmentación de las sustancias en cristales más pequeños y facilitar así su disolución.
- 5.- Espectrofotómetro BECKMAN DB-T con registro, utilizado para la determinación del máximo de absorción de cada sustancia medicamentosa.
- 6.- Medidor de pH (CRISON, microPH 2001), para el ajuste de las soluciones a los pH ensayados y para control de las variaciones de pH de la solución medicamentosa durante la experiencia.
- 7.- Vórtex DINCRO para la agitación de tubos.
- 8.- Ordenador personal IBM PC para el tratamiento de los datos experimentales.
- 9.- Cromatógrafo líquido de alta eficacia (HPLC) de la firma KONTRON, equipado con los siguientes elementos: a) dos bombas modelo 420, b) mezclador M-800/491, c) inyector automático modelo 460, d) Multitask valve LCS 870, e) Multiport, f) detector modelo 432, UV de longitud de onda variable y g) ordenador COMPAQ Deskpro 286.
- 10.- Bomba de perfusión: PERISTALTIC PUMP P-3 (Pharmacia Fine Chemicals) para el bombeo de la solución medicamentosa a través del circuito de perfusión.

2.1.5. SOLUCIONES PARA ENSAYO.

2.1.5.1. Solución para anestesia.

Se utiliza una solución al 25% (P/V) de etiluretano en agua destilada. Para ello se pesan 6.25 g de la sustancia que se depositan en un matraz aforado de 25 ml de capacidad. Se añaden unos 20 ml de agua destilada, se agita hasta disolución completa y se enrasa con agua destilada hasta 25 ml. La

solución obtenida se guarda en viales en el refrigerador hasta su utilización.

2.1.5.2. Líquidos de lavado.

Para el lavado previo del intestino se ha utilizado solución salina y para el segundo lavado una solución tampón de tris(hidroximetil)aminometano (trometamina) ajustada con ácido clorhídrico concentrado a un pH óptimo en función de la solubilidad de cada fluoquinolona ensayada (ver CUADRO I).

La solución tampón se prepara disolviendo 12.1 g de trometamina en c.s. de agua destilada para 100 ml.

En nuestro caso se ha empleado trometamina de la firma MERCK, referencia número 8382.

2.1.5.3. Soluciones medicamentosas.

Para el estudio de la absorción intestinal de las fluoquinolonas por el método de perfusión, se han preparado las soluciones de fármaco en tampón trometamina. La cantidad de fármaco a disolver es de 50 mg de la fluoquinolona, equivalente en base, a la que se añade c.s. de la solución tampón hasta 100 ml.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es el pH de la solución tampón, para conseguir la disolución total de la fluoquinolona. Cada fluoquinolona posee un pH óptimo como se indica en el CUADRO I:

QUINOLONA	pH
NORFLOXACINA	6.9
CIPROFLOXACINA	5.5
PEFLOXACINA	5.7
CNV 8804	7.5
CNV 8802	7.7

CUADRO I

De acuerdo con lo expuesto, una vez preparada la disolución tampón se procede a la disolución del fármaco y queda lista para su empleo la solución medicamentosa.

En el caso de la pefloxacina y de la fluoquinolona CNV 8804, se disuelve primero el fármaco en 4 ml de hidróxido sódico 0.1N y luego se añade c.s. del tampón hasta el enrase.

Para la fluoquinolona CNV 8802, la cantidad necesaria de NaOH 0.1N para preparar la solución es de 6 ml.

Se utilizan en cada experiencia 40 ml de solución medicamentosa.

2.1.6. TECNICAS BIOLOGICAS.

Se describe a continuación la metódica de trabajo seguida para cada una de las técnicas biológicas realizadas en la elaboración de la presente Memoria.

2.1.6.1. Operaciones previas: anestesia.

Se toma al animal, se pesa y se procede a su anestesia. Para ello se administra una inyección intraperitoneal de etiluretano a razón de 0.4 ml de la solución del anestésico al 25% por cada 100 g de peso del animal, mediante una jeringuilla de insulina provista de su aguja correspondiente.

A continuación se espera de 5 a 10 minutos, necesarios para que se produzca una anestesia profunda, lo cual se comprobará tocando con el extremo de una pinza el globo ocular del animal. Si la anestesia es profunda, no se observa parpadeo.

Cuando el reflejo parpebral ha desaparecido, se procede a la fijación del animal para su intervención, de modo que quede colocado en el centro de la pieza base de acero inoxidable en posición de decúbito supino y con las extremidades extendidas y fijadas a la pieza base mediante pinzas apropiadas.

Durante todo el tiempo que dura la experiencia debe vigilarse el estado de la rata y la eficacia del anestésico con ayuda del reflejo parpebral. En caso de manifestarse éste, se coloca junto al hocico del animal y durante tiempos breves, un algodón humedecido con éter. Hay que evitar, siempre que sea posible, la administración de éter y en el caso de hacerlo, en tiempos breves, para evitar la muerte del animal por depresión respiratoria.

2.1.6.2. Técnica quirúrgica utilizada.

Una vez situado el animal sobre la pieza base y comprobada la anestesia, se practican dos incisiones en el abdomen del animal. El fin que con ello se persigue es localizar el estómago y el ciego para poder después canular el intestino delgado. En estas condiciones, el intestino no queda al descubierto, sino que permanece cubierto por músculos y piel abdominales.

Con todo ello se consigue mantener al intestino y al animal en las condiciones más parecidas a las fisiológicas, lo que conlleva las siguientes ventajas:

- 1.- Hay poca manipulación del intestino y quedan en disposición natural las asas intestinales.
- 2.- Permanencia del intestino en las condiciones de temperatura y humedad fisiológicas.
- 3.- La propia presión ejercida por los músculos y piel abdominales evita la distensión exagerada de las paredes del intestino que influye en las variaciones de volumen de la solución medicamentosa a lo largo de la experiencia.

Las dos incisiones se realizan en el lado derecho del abdomen. Para localizar el estómago, se incide aproximadamente 1 cm por debajo de las costillas y para localizar el ciego, la incisión se realiza en la zona pélvica. En ambos casos debe cortarse primero la piel, desbridar un área de 1-2 cm² y por último se incide en el músculo. Hechas las dos incisiones y con la ayuda de unas pinzas pequeñas de punta roma, se localiza el estómago y el ciego, que se extraerán lo necesario para poder canular el intestino delgado.

La canulación se realiza de la siguiente forma: a unos 2.5 cm del píloro se pasa una hebra de seda por debajo del intestino, perforando el peritoneo con ayuda de las pinzas pequeñas. A continuación, se hace un corte transversal en V en el intestino con las tijeras pequeñas y se introduce por la abertura practicada una de las cánulas, que se asegura fuertemente mediante una ligadura con la hebra de seda.

Posteriormente se canula la zona final del íleon, procediendo de forma similar al caso anterior.

2.1.6.3. Montaje de la preparación para la perfusión.

Una vez canulado el intestino delgado, se une a la

cock" y a ésta se encaja una jeringa de 5 ml. El conjunto se fija, verticalmente, a un soporte de forma que el brazo horizontal de la cánula quede a una altura adecuada y no resulte forzada la posición natural del órgano. En estas condiciones y con la llave de paso en posición lumen-exterior, se llena la jeringa con agua destilada y se deja fluir, presionando ligeramente el émbolo a través del intestino delgado. El agua arrastra la suciedad y sale por la cánula del otro extremo, si bien es conveniente realizar este primer lavado con la incisión en V en la zona ileal del intestino pero sin llegar a canular. Con ello se evita una posible obturación de la cánula y además el intestino se halla más distendido, lo cual facilita el proceso de lavado.

El agua de lavado procedente del intestino, se recoge en un recipiente, y se repite la operación hasta que el líquido salga sin residuos y el intestino quede limpio.

Finalmente, se hacen pasar por el intestino unos 5 ml de solución tampón de trometamina al pH óptimo según con la fluoquinolona que se vaya a estudiar.

Se termina de expulsar el líquido remanente bombeando varias veces aire con la jeringa.

Una vez limpio el intestino, se separa la cánula ileal de la llave de tres pasos "stopcock" quedando ahora las dos cánulas libres para ser conectadas al circuito.

Dicho circuito consta de un reservorio que contiene la solución medicamentosa a perfundir. De él sale un tubo de polietileno de 60 cm de longitud que conecta con el tubo de la bomba peristáltica. Este tubo tiene a su vez 31 cm de longitud y se empalma con otra porción de tubo de polietileno (25 cm) que a su vez conecta con la cánula de entrada o duodenal. Después del intestino se sitúa la cánula de salida o ileal a la que le sigue la última porción de tubo (22 cm) que enlaza con el reservorio.

Como reservorio se utiliza una probeta graduada de 50 ml y, en su interior, se sitúa un núcleo magnético de agitación con el objeto de homogenizar la solución medicamentosa que circula. El montaje se detalla en las FIGURAS 1 y 2 y en la FIGURA 3 puede observarse el conjunto del sistema.

Una vez montado el circuito de perfusión, se está en condiciones de estudiar el proceso de absorción de los fármacos sometidos a estudio en el animal de experimentación utilizado.

2.1.7. METODOLOGIA ANALITICA.

2.1.7.1. Toma de muestras y valoración del fármaco.

La experiencia se inicia con 40 ml exactamente medidos de solución medicamentosa en el reservorio. Se estima el valor del pH de la solución y se anota. Corresponde al pH inicial.

Se pone en marcha la bomba del circuito: interruptor en ON y velocidad de flujo en posición 10 (3.8 - 3.9 ml/min), así como el agitador.

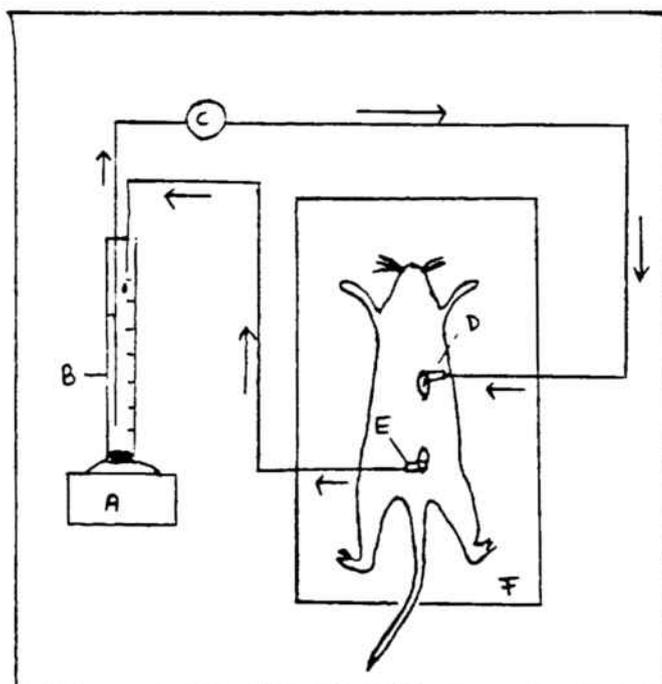


FIGURA 1

Esquema del sistema de perfusión.

- A: Agitador
- B: Reservorio
- C: Bomba peristáltica
- D: Cánula duodenal
- E: Cánula ileal
- F: Pieza base de acero inoxidable

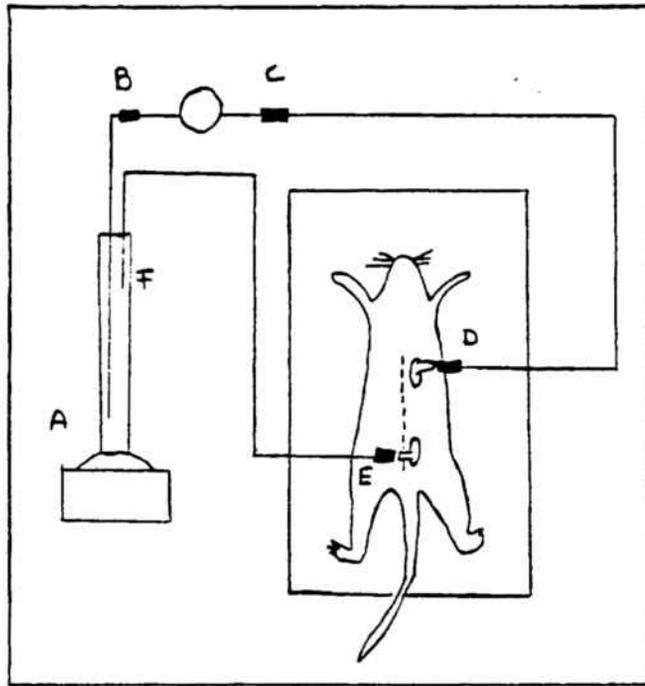
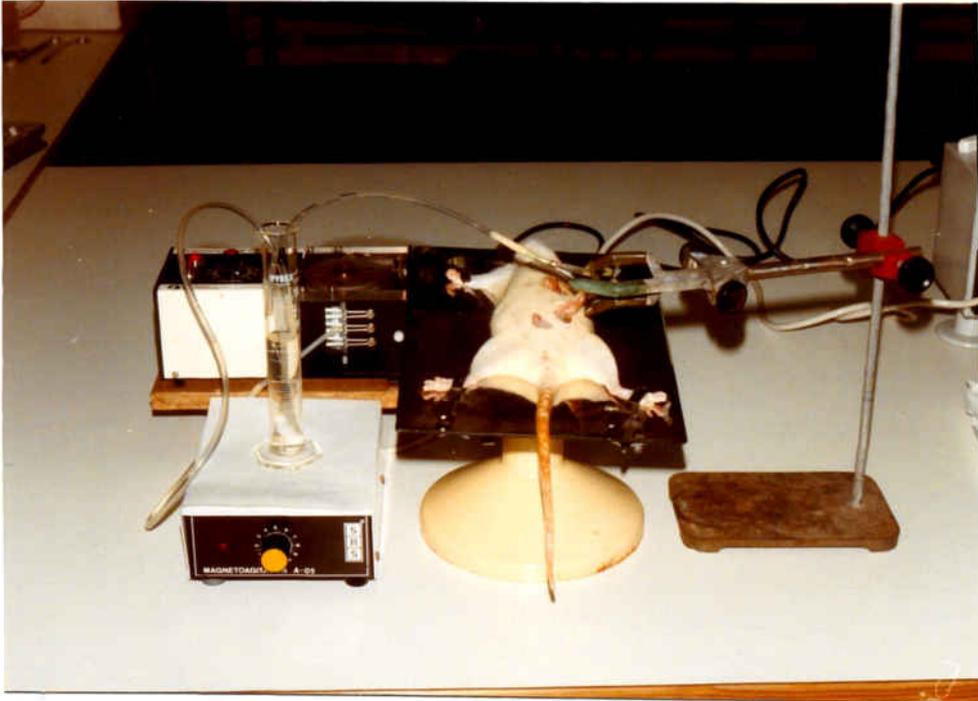


FIGURA 2

Detalles del montaje del sistema de perfusión:
empalmes (■) y dimensiones.

Segmento AB: 60 cm
 Segmento BC: 31 cm
 Segmento CD: 25 cm
 Segmento EF: 22 cm
 Segmento DE: ≈ 90 cm



Fotografía del sistema de perfusión.

FIGURA 3

La solución medicamentosa empieza a ascender por el tubo (dirección AD de la FIGURA 2). A medida que la solución va avanzando, se van vertiendo en el reservorio restos de los líquidos de lavado que han quedado en el intestino intercalados con aire. Como tiempo inicial, se toma aquél en el que se vierte la primera gota de solución medicamentosa en el reservorio, una vez que ha circulado a través del intestino; en este momento se observa que la solución medicamentosa circula ya de forma continua.

Cuando se deposita la primera gota de la solución de perfusión en el reservorio, se pone en marcha el cronómetro y, con una jeringuilla de insulina se toma una muestra de 0.3 ml directamente del reservorio. Será el valor inicial en la determinación analítica.

Transcurridos 15 minutos se extrae otra muestra de 0.3 ml y, así sucesivamente cada cuarto de hora hasta transcurridas las dos horas que dura la experiencia.

Después de la toma de la última muestra, se mide el pH final de la solución medicamentosa.

La técnica analítica utilizada para la valoración del fármaco en los líquidos remanentes, ha sido por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La primera premisa a tener en cuenta, es validar la técnica analítica a utilizar a fin de comprobar la bondad de la misma y dilucidar si las diferencias de los valores obtenidos en un mismo día o en determinaciones realizadas en días distintos, no influyen significativamente en los resultados. Con este objetivo se han elaborado para cada fármaco, cinco rectas de calibrado intra-día y cinco interdía, y se ha calculado en cada caso el coeficiente de variación y el error relativo, que son un índice de la precisión y la exactitud de la metódica utilizada.

Para obtener las ecuaciones correspondientes de las rectas de calibrado se preparan cinco soluciones estándar de fármaco y un blanco. El blanco, para todas las fluoquinolonas ensayadas menos para la quinolona CNV 8804, es ácido clorhídrico 0.1N. Para esta última, el blanco es agua calidad HPLC.

La preparación de las soluciones estándar, excepto para la quinolona CNV 8804, se realiza como sigue: se pesan analíticamente 50 mg de la fluoquinolona y se lleva a un matraz aforado de 100 ml. Se añaden aproximadamente unos 95 ml de HCl 0.1N y se sonica en un baño de ultrasonidos durante unos minutos, hasta su total disolución. Se enrasa con HCl 0.1N hasta el aforo y se agita. Esta solución corresponde a la solución madre (A) a partir de la cual se obtienen las soluciones hijas, por diluciones sucesivas tal como de detalla a continuación:

- 1 ml solución A + 9 ml HCl 0.1N (solución B)
- 1 ml solución B + 1 ml HCl 0.1N (solución C)
- 1 ml solución C + 1 ml HCl 0.1N (solución D)
- 1 ml solución D + 1 ml HCl 0.1N (solución E)
- 1 ml solución E + 1 ml HCl 0.1N (solución F)

Se utiliza la solución B como solución inicial para preparar la recta. El rango de concentraciones estudiado, así como el factor de dilución se detallan en el CUADRO II.

C ($\mu\text{g/ml}$)	Factor dilución	Solución
50	1	B
25	2	C
12.5	4	D
6.25	8	E
3.125	16	F
Blanco	-	-

CUADRO II

Las diluciones se realizan en tubos de ensayo y se agita cada vez con la ayuda de un vórtex.

Para la fluoquinolona CNV 8804, pesados analíticamente 50 mg de la misma, se disuelven en un matraz de 100 ml con 4.5 ml de NaOH 0.1N y, a continuación se añade c.s. de agua calidad HPLC hasta enrase. Las diluciones se realizan también en este caso como se ha descrito anteriormente, pero utilizando como diluyente agua calidad HPLC en lugar de HCl 0.1N.

Las condiciones cromatográficas empleadas para la valoración de las soluciones medicamentosas son las siguientes:

- a) Columna: "Ultrasphere XL-ODS", 3 μm .
- b) Eluyente: Metanol/ KH_2PO_4 10 mM, conteniendo ácido heptanosulfónico al 0.0028% (pH = 3.0). Las proporciones de ambas fases se exponen en el CUADRO III.
- c) Flujo: 0.6 - 1 ml/min
- d) Volumen de inyección: 20 μl .
- e) Sensibilidad: 0.05
- f) Detección: a la luz UV en el máximo de absorción correspondiente (CUADRO III).

El tampón fosfato utilizado se prepara disolviendo 2.48 g de fosfato monopotásico en c.s. de agua calidad HPLC para un litro. Se disuelven en él 20 mg de ácido heptanosulfónico por cada 700 ml y se ajusta con ácido fosfórico concentrado hasta pH=3. Una vez preparada la solución se filtra a través de un filtro de nylon de 0.45 μm de diámetro de poro y se sonica durante unos minutos para eliminar el posible aire que haya quedado retenido.

En el CUADRO III se detallan las condiciones analíticas particulares de cada quinolona: la λ_{max} y las proporciones de fase orgánica/fase acuosa del eluyente:

QUINOLONA	LAMBDA _{MAX}	Metanol/tampón fosfato
NORFLOXACINA	276	40:60
CIPROFLOXACINA	273	50:50
PEFLOXACINA	276	50:50
CNV 8804	261	70:30
CNV 8802	277	70:30

CUADRO III

Una vez validada la técnica puede procederse a la valoración de las muestras biológicas. Para ello se preparan una serie de tubos rotulados con los siguientes tiempos: blanco, inicial, 15 minutos, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos. El blanco corresponde a una solución de HCl 0.1N menos para la quinolona CNV 8804 para la que se utiliza agua calidad HPLC. Para el resto de muestras, se toman 0.20 ml de cada una y se diluye con c.s. de HCl 0.1N hasta 5 ml, excepto la fluoquinolona CNV 8804 que la dilución se realiza con agua calidad HPLC.

Una parte alícuota de las muestras preparadas, previa agitación de las mismas, se deposita en viales de HPLC para su posterior análisis.

Se prepara una recta de calibrado con la fluoquinolona ensayada y se valoran las muestras bajo las condiciones cromatográficas ya indicadas.

2.2. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DE VOLUMEN DE LA SOLUCION MEDICAMENTOSA.

El cálculo de la constante de velocidad de absorción por métodos directos, como es sabido, se realiza a partir de las cantidades o concentraciones de fármaco remanentes en la solución medicamentosa sometida a estudio. Por este motivo, es obvio, que el volumen empleado en la experiencia de la solución medicamentosa debe permanecer constante a lo largo de todo el estudio a fin de obtener resultados fiables en la estimación de la constante de velocidad de absorción.

No obstante, se ha puesto de manifiesto que independientemente de la metódica empleada para el cálculo de este parámetro de absorción, en todos los casos se producen variaciones de volumen en la solución medicamentosa que influyen en la exactitud de cálculo de la constante de velocidad de absorción (79, 80).

En la presente Memoria, para el estudio de las variaciones de volumen de las soluciones medicamentosas ensayadas, se han desarrollado dos métodos distintas:

- a) Utilizando un trazador clásico: Polietilenglicol 4000 marcado (^{14}C -PEG 4000), que en principio, se asume su no absorbabilidad.
- b) Por medida directa de las variaciones de la solución medicamentosa.

2.2.1. TECNICA POR CENTELLEO LIQUIDO.

2.2.1.1. Material usual y material especial para técnicas radiactivas.

- 1.- Matraces aforados de 10 ml.
- 2.- Vasos de precipitados.
- 3.- Guantes desechables de cirugía.
- 4.- Bandejas especiales para realizar la experiencia.
- 5.- Papel de filtro para forrar las bandejas y superficies de trabajo.
- 6.- Viales de plástico desechables con tapón adaptable de 5 ml de capacidad.
- 7.- Viales de vidrio de 20 ml de capacidad.
- 8.- Pipetas automáticas de volumen variable de 1-100 μl y de 1-5 ml (PIPETMAN-GILSON). Puntas de plástico desechables.
- 9.- Racks para colocar los viales que contienen la solución radioactiva.

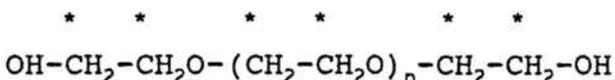
2.2.1.2. Aparatos especiales y de medida para la técnica radiactiva.

- 1.- Centrífuga SELECTA para separar la fase líquida del sedimento procedente de la trituration del intestino delgado.
- 2.- Contador de centelleo líquido LKB, modelo 1217, dotado de un microprocesador que permite: a) efectuar el ajustado de las curvas de eficiencia-"quenching" obtenidas a partir de los viales patrón previamente preparados para este fin; b) el cálculo automático de las desintegraciones por minuto (d.p.m.) a partir de las cuentas por minuto (c.p.m.) halladas en las muestras problema y del "quenching" evaluado mediante el método de la relación de canales con estándar externo.

2.2.1.3. Soluciones para ensayo en la técnica radiactiva.

a) Polietilenglicol.

En la presente Memoria se ha utilizado ^{14}C -PEG 4000, de la firma DU PONT, número de catálogo NEC-473. Su estructura es la siguiente:



Se trata de un sólido blanco cristalino con una actividad específica de 0.1-1 mCi/g.

b) Solución centelleadora.

La solución centelleadora utilizada ha sido el cocktail INSTA-GEL II de la firma Packard .

2.2.1.4. Determinación del ^{14}C -PEG 4000 por centelleo líquido.

a) En la solución medicamentosa.

El centelleo líquido es una técnica de medición de radioactividad basada en transformar la energía radiactiva en energía luminosa, la cual es medida instrumentalmente mediante su conversión en energía eléctrica. Esta técnica resulta muy adecuada para cuantificar emisores β débiles.

La transformación radiactividad-luz tiene lugar dentro de un vial en el que, junto con la muestra radiactiva, se colocan disolventes y sustancias centelleadoras. La di-

solución centelleadora transforma la energía de las partículas β emitidas por la muestra, en destellos luminosos (fotones) emitidos a una longitud de onda detectable por el aparato.

La finalidad de las determinaciones por centelleo líquido, consiste en averiguar la actividad de la muestra expresada, por ejemplo, en desintegraciones por minuto (d.p.m.). Para calcular este valor a partir de las cuentas por minuto (c.p.m.) halladas por el instrumento, se requiere conocer la eficiencia del contaje, parámetro que viene definido por la relación:

$$E = \frac{\text{valor hallado (cpm)}}{\text{valor real (dpm)}} \quad (\text{Ec. 1})$$

En la presente Memoria se ha utilizado para obtener la curva de calibración el método del estándar externo con relación de canales. El fundamento de dicho método se basa en hacer aparecer partículas β en el interior del vial sin necesidad de adicionar un estándar interno. Mediante este procedimiento se obtiene una curva de calibrado que relaciona la eficiencia con la relación de canales tal como se detalla en la FIGURA 4.

La secuencia de trabajo del método es la siguiente:

- 1.- La muestra se cuenta en condiciones idóneas para el isótopo de trabajo durante el tiempo requerido. Sea C las cuentas halladas en el canal con las condiciones elegidas.
- 2.- La muestra se cuenta de nuevo, con el estándar externo junto al vial, durante un tiempo que suele ser de 30 segundos en unas ventanas A y B prefijadas según sea la naturaleza del estándar externo utilizado. Sean C_{1A} y C_{1B} las cuentas halladas en los canales A y B respectivamente.
- 3.- Se vuelve a contar la muestra pero sin el estándar externo en las mismas ventanas e igual tiempo (C_{2A} y C_{2B}).

La relación de canales A y B se calcula mediante la expresión:

$$\frac{B}{A} = \frac{C_{1B} - C_{2B}}{C_{1A} - C_{2A}}$$

siendo $C_{1B}-C_{2B}$ las cuentas aparecidas en el canal B debidas sólo al patrón externo y $C_{1A}-C_{2A}$ las cuentas aparecidas en el canal A debidas sólo al patrón externo.

Si las muestras son patrones con un número conocido de d.p.m. (D), se calculan las eficiencias a partir de las c.p.m. (C) halladas ($E= C/D$) y se traza la curva de calibración frente a los cocientes B/A respectivos.

Para conocer las d.p.m. de una muestra problema, el espectrómetro de centelleo calcula los valores de c.p.m. y B/A. A continuación interpola, en la curva de calibración, el valor de B/A y el propio aparato obtiene el valor de la eficiencia. Conocida ésta y las c.p.m., las d.p.m. de la muestra se calculan por aplicación directa de la ecuación 1.

El espectrómetro de centelleo líquido utilizado en los experimentos, está dotado de un microprocesador que permite el cálculo automático de las curvas de calibración a partir de los viales previamente preparados.

Una vez almacenada en memoria la curva patrón, el contador realiza los cálculos pertinentes y estima las d.p.m. de cada vial.

Para confeccionar la recta de calibrado, se procede del modo siguiente:

A cinco tubos de plástico especiales para estudios de centelleo, se depositan 4 ml de cocktail INSTA-GEL II. A cada uno de ellos se les adiciona cantidades crecientes de solución tampón de Trometamina (pH=6.2) 0.1, 0.5, 1, 1.5, y 2 ml y a continuación se someten a agitación suave. Seguidamente, se incorpora a cada uno de los tubos una cantidad constante, 10 μ l, de patrón radiactivo (n-hexadecano- ^{14}C). Utilizando como patrón externo Radio 226, se procede a confeccionar la recta de calibrado.

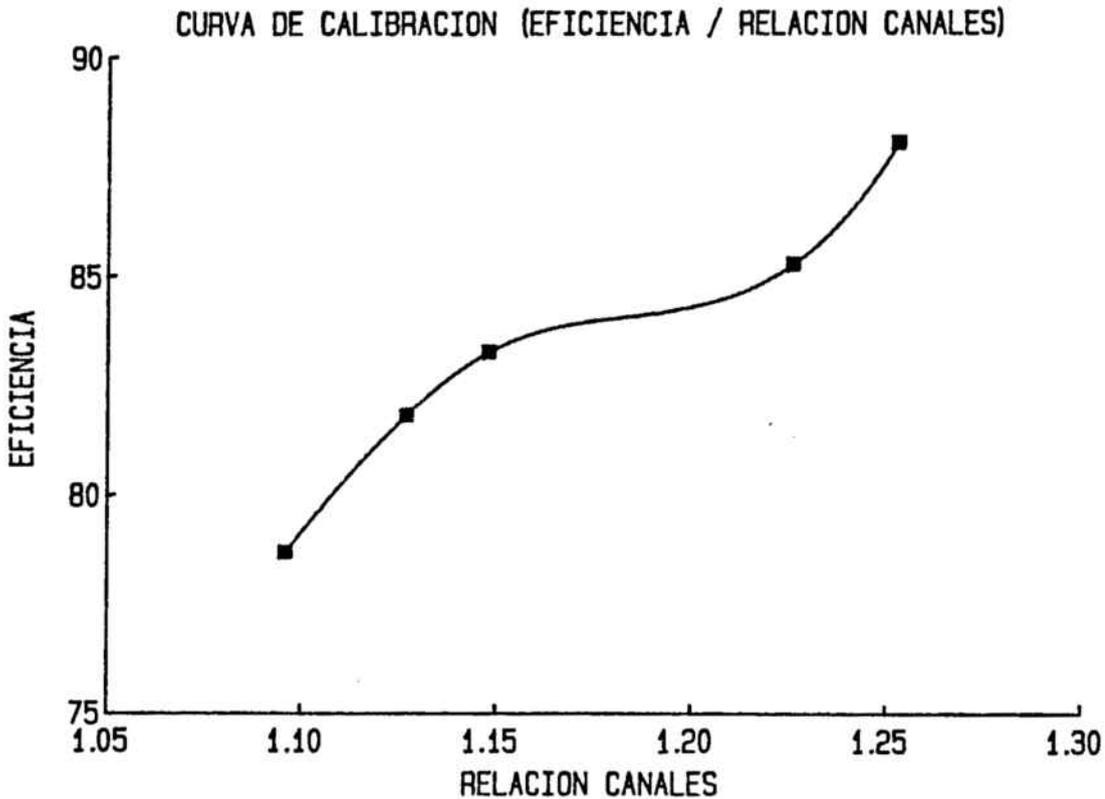


FIGURA 4

El estudio de las variaciones de volumen mediante la utilización de ^{14}C -PEG 4000 se realiza después de preparado el sistema de perfusión de acuerdo con los epígrafes 2.1.5. y 2.1.6. La solución centelleadora se prepara disolviendo $50\ \mu\text{Ci}$ de ^{14}C -PEG 4000 en 10 ml de agua calidad HPLC. A continuación se toma de esta solución 0.1 ml ($0.5\ \mu\text{Ci}$) y se depositan en 50 ml de solución medicamentosa. Se depositan 40 ml de esta última solución en el circuito de perfusión y se inicia la experiencia. A los tiempos prefijados 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 minutos, se toman 0.2 ml de la solución de perfusión y se depositan en tubos de plástico apropiados. Se adiciona 4 ml de INSTA-GEL, se agita y se depositan los tubos de plástico en viales de vidrio. Estas se sitúan en los racks y se procede a la valoración del ^{14}C -PEG 4000.

b) En el intestino delgado de rata.

A fin de dilucidar si parte del marcador utilizado queda adherido o retenido por la mucosa del intestino delgado de la rata, se procede a detectar si se confirma este hecho. Para ello, una vez finalizada la experiencia y, previo sacri-

ficio del animal, se aísla la zona anatómica sometida a estudio y se separa del animal. Posteriormente el intestino delgado aislado se tritura con ayuda de un homogenizador y se sitúa el homogeneizado en un tubo al que se le añaden 10 ml de solución tampón de trometamina y se centrifuga durante 15 minutos al máximo de r.p.m. de la centrífuga, previa agitación del conjunto. Se toman 0.2 ml del sobrenadante y se procede a la determinación del ^{14}C -PEG 4000 tal como se ha detallado en el apartado a.

2.2.2. METODO DIRECTO.

De acuerdo con la metódica propuesta por C. GABUS-SANNIÉ (81) y, dado que la longitud de los tubos que constituyen el circuito es constante y fija para todas las experiencias, así como el volumen inicial de la solución medicamentosa (40 ml), es posible estimar las variaciones de volumen de la solución problema a lo largo de toda la experiencia.

Para ello se utiliza la probeta contrastada que sirve de reservorio en la experiencia. La metódica empleada en la presente Memoria es la siguiente:

En el desarrollo del montaje de la metódica para la estimación de la constante de velocidad de absorción de los fármacos sometidos a estudio, en el momento en que se deposita la primera gota de la solución de perfusión en el reservorio (probeta graduada), se pone en marcha el cronómetro y se anota el volumen de solución medicamentosa en la probeta (volumen a tiempo cero $-V_0-$). Transcurridos 15 minutos se vuelve a anotar el volumen indicado en el reservorio y, así sucesivamente, hasta el último tiempo experimental (volumen a tiempo $t -V_t-$). El volumen final (V_f) se determina, recogiendo la totalidad del líquido circulante. Para ello, manteniendo la bomba peristáltica en funcionamiento, se separa el tubo del circuito por el extremo A (FIGURA 2) de la solución medicamentosa y se mantiene el circuito en estas condiciones hasta que todo el líquido se haya vertido en el reservorio, demorando el final de la operación unos minutos a fin de que la corriente de aire circulante a través del intestino arrastre la totalidad de la fracción residual de líquido. Finalizada la operación se lee en la probeta el volumen final (V_f).

La variación de volumen real se estima mediante la siguiente expresión:

$$\text{VVR} = V_i - V_f T \quad (\text{Ec. 2})$$

$$V_i = V_f + (V_0 - V_t) \quad (\text{Ec. 3})$$

$$V_f T = V_f + V_m \quad (\text{Ec. 4})$$

siendo:

VVR = Variación de volumen real.

V_i = Volumen inicial.

V_f = Volumen final.

V_0 = Volumen leído en la probeta al inicio de la experiencia.

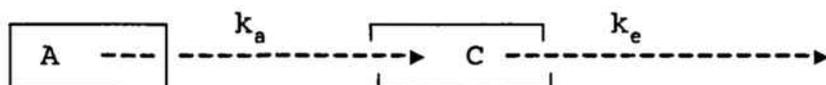
V_t = Volumen leído en la probeta al finalizar la experiencia.

V_{fT} = Volumen final total.

V_m = Volumen correspondiente a las tomas de muestras.

2.3. ESTIMACION DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ABSORCION.

Como se sabe, la absorción de los fármacos sigue pautas cinéticas bien definidas. En el caso de los fármacos usuales, como los que contempla esta Memoria, la absorción es por difusión pasiva y el modelo cinético a considerar podría esquematizarse como se indica a continuación:



El primer compartimiento **A** corresponde al lugar de absorción. El fármaco sale del mismo a una velocidad regida por la constante k_a . Esta velocidad de salida es la que hay que considerar, puesto que, es también la velocidad de entrada en plasma y por consiguiente la velocidad de absorción.

La constante de velocidad rige la velocidad a que se absorbe un fármaco a partir del lugar de absorción en que se encuentra o, si se quiere, la velocidad a que pasa el fármaco desde el lugar de absorción al plasma sanguíneo.

Ya se ha comentado que se refiere a la concentración o cantidad remanente en el lugar de absorción, con la que, siendo una constante de primer orden se cumplirá:

$$\frac{dA}{dt} = -k_a \cdot A \quad (\text{Ec. 5})$$

siendo dA/dt la disminución de la concentración de fármaco en los lugares de absorción en función del tiempo o velocidad de desaparición y, A la concentración remanente en dicho compartimiento.

Resulta obvio que la concentración en un instante t vendrá definida por la suma de todas las concentraciones instantáneas desde tiempo cero hasta tiempo t , es decir, por la integral de la ecuación anterior, cuya expresión matemática es la siguiente:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_a t} \quad (\text{Ec. 6})$$

siendo A la concentración a un tiempo t y A_0 la concentración inicial objetivable a tiempo cero, obtenida por extrapolación de la curva representativa del proceso hasta el eje de ordenadas.

La transformación logarítmica de la función exponencial, permite obtener la ecuación de una recta, siendo su expresión matemática:

$$\ln A = -k_a t + \ln A_0 \quad (\text{Ec. 7})$$

La pendiente, en valor absoluto, de la recta que relaciona las concentraciones remanentes frente al tiempo corresponde a la constante de velocidad de absorción.

Teóricamente y en ausencia de errores experimentales, el valor de A_0 debería ser del 100%. El método biológico original (82, 83) hace referencia a que, antes de los cinco primeros minutos, existe una adsorción del soluto a la mucosa intestinal regida por la ley de acción de masas, lo que conduce a una pérdida en la concentración, provocando valores notablemente inferiores al 100%. Ello se acentúa debido a la dilución de la disolución de perfusión con restos de disolución de lavado.

Por este motivo, en nuestras condiciones experimentales, hemos estimado las concentraciones de medicamento remanentes entre los 15 y 120 minutos. En definitiva, estimado el tabulado experimental concentración remanente/tiempo, se procede a la regresión lineal semilogarítmica entre estas variables y, la pendiente en valor absoluto de la recta correspondiente equivale a la constante de velocidad de absorción.

CAPITULO 3º

3. RESULTADOS

3.1. VALIDACION DE LA TECNICA ANALITICA.

Se exponen en este epígrafe los resultados obtenidos en la validación de la técnica analítica utilizada para la estimación de las concentraciones remanentes de fármaco en el circuito de perfusión correspondiente a cada uno de los fármacos sometidos a estudio.

De los CUADROS I a X se detallan los valores de las concentraciones de fármaco estimadas (cinco replicados) frente a las concentraciones teóricas. Para cada fármaco se consignan los resultados correspondientes a los estudios intradía e interdía acompañados de los parámetros representativos de la exactitud de la técnica (error relativo -E-) y de la precisión de la misma (coeficiente de variación porcentual -%c.v.-).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la técnica analítica utilizada para el cálculo de la constante de velocidad de absorción es exacta y precisa tanto en las determinaciones efectuadas intradía como interdía entre el rango de concentraciones comprendido entre 6.25 y 50 $\mu\text{g/ml}$, con un error relativo comprendido entre 6.0 y -3.39 % y un coeficiente de variación comprendido entre 8.02 y 0.15 %.

Sin embargo, a concentraciones inferiores a 3.125 $\mu\text{g/ml}$, la técnica ya no resulta tan exacta y precisa, seguramente, debido a la escasa sensibilidad de la misma para estas concentraciones tan bajas. Sin embargo, debido a que en los ensayos preliminares se comprobó que las concentraciones remanentes en el circuito de perfusión se situaban en el margen entre 6.25 y 50 $\mu\text{g/ml}$, las rectas de calibrado utilizadas para las estimaciones de las concentraciones en todas las experiencias realizadas en la presente Memoria, se confeccionaron utilizando concentraciones patrón en el ámbito entre 6.25 y 50 $\mu\text{g/ml}$.

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.066	6.203	12.461	25.255	49.890
	3.735	6.497	12.072	24.131	50.442
	3.369	6.407	12.341	24.521	50.236
	3.729	6.511	11.807	24.501	50.327
	3.738	6.562	12.182	23.866	50.526
\bar{x}	3.527	6.436	12.173	24.454	50.284
E%	12.87	2.98	-2.62	-2.18	0.57
s	0.302	0.142	0.253	0.524	0.246
cv%	8.58	2.20	2.07	2.14	0.49

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados intradía para la NORFLOXACINA.

CUADRO I

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.796	6.260	12.324	24.041	50.438
	3.592	6.652	12.084	24.101	50.436
	3.596	6.528	12.258	24.043	50.436
	3.615	6.582	12.216	23.975	50.457
	3.115	6.316	12.676	24.620	50.102
\bar{x}	3.543	6.468	12.311	24.156	50.374
E%	13.37	3.48	-1.506	-3.37	0.75
s	0.254	0.171	0.222	0.263	0.152
cv%	7.16	2.64	1.80	1.09	0.30

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados interdía para la NORFLOXACINA.

CUADRO II

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.561	6.311	12.410	24.246	50.347
	3.833	6.018	12.152	24.616	50.225
	3.379	6.323	12.214	24.833	50.126
	3.435	6.344	12.447	24.359	50.291
	3.703	6.491	12.295	23.879	50.506
\bar{x}	3.582	6.297	12.304	24.387	50.299
E%	14.63	0.75	-1.57	-2.45	0.59
s	0.188	0.172	0.125	0.364	0.142
cv%	5.23	2.73	1.01	1.49	0.28

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados intradía para la CIPROFLOXACINA.

CUADRO III

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	2.993	5.573	12.162	27.202	48.495
	3.585	6.292	12.280	24.421	50.297
	2.660	6.155	12.430	26.226	49.404
	3.834	6.020	12.156	24.624	50.241
	3.631	6.619	11.998	24.215	50.412
\bar{x}	3.341	6.132	12.205	25.337	49.859
E%	6.89	-1.89	-2.35	1.34	-0.28
s	0.493	0.383	0.161	1.311	0.650
cv%	14.75	6.25	1.31	5.17	1.30

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados interdía para la CIPROFLOXACINA.

CUADRO IV

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.631	6.537	12.064	24.231	50.375
	3.592	6.257	12.603	23.936	50.349
	3.989	6.737	11.398	24.251	50.418
	3.419	6.380	12.265	24.556	50.198
	3.792	6.258	12.104	24.364	50.338
\bar{X}	3.685	6.434	12.087	24.267	50.336
E%	17.91	2.94	-3.30	-2.93	0.67
s	0.216	0.205	0.440	0.226	0.083
cv%	5.85	3.18	3.64	0.93	0.16

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados intradía para la PEFLOXACINA

CUADRO V

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.526	6.080	12.593	24.388	50.213
	3.631	6.537	12.064	24.231	50.375
	3.410	6.063	12.377	24.943	50.016
	4.085	6.559	12.198	23.208	50.653
	3.737	5.821	12.281	24.885	50.029
\bar{X}	3.678	6.212	12.303	24.331	50.257
E%	17.69	-0.61	-1.58	-2.67	0.05
s	0.258	0.323	0.199	0.699	0.266
cv%	7.02	5.21	1.61	2.87	1.15

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados interdía para la PEFLOXACINA

CUADRO VI

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.637	5.940	12.555	24.496	50.194
	4.213	6.131	12.100	23.846	50.510
	3.949	5.756	12.442	24.485	50.295
	3.854	6.831	11.638	24.019	50.524
	3.561	6.656	12.237	23.912	50.463
\bar{x}	3.843	6.263	12.194	24.152	50.397
E%	22.98	0.20	-2.44	-3.39	0.79
s	0.260	0.463	0.356	0.316	0.146
cv%	6.76	7.39	2.93	1.31	0.29

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados intradía para la CNV 8804

CUADRO VII

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.637	5.940	12.555	24.496	50.194
	3.706	6.111	12.310	24.441	50.256
	3.920	6.032	12.327	24.172	50.350
	4.077	5.938	12.262	24.149	50.365
	3.895	6.281	12.029	24.230	50.365
\bar{x}	3.847	6.060	12.297	24.298	50.306
E%	23.10	-3.04	-1.62	-2.81	0.61
s	0.176	0.143	0.187	0.160	0.077
cv%	4.57	2.36	1.52	0.66	0.15

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados interdía para la CNV 8804

CUADRO VIII

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.801	5.874	12.047	25.101	50.048
	3.721	6.546	12.194	23.897	50.507
	3.231	5.945	12.340	25.585	49.757
	3.470	6.922	12.909	25.423	50.479
	4.107	6.346	12.229	23.539	50.651
\bar{X}	3.666	6.327	12.344	24.709	50.288
E%	17.31	1.23	-1.25	-1.16	0.58
s	0.333	0.434	0.333	0.930	0.373
cv%	9.08	6.86	2.70	3.76	0.74

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados intradía para la CNV 8802.

CUADRO IX

CONCENTRACIONES TEORICAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.125	6.25	12.5	25	50
CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES ESTIMADAS ($\mu\text{g/ml}$)					
	3.043	6.895	12.604	23.932	50.391
	2.339	7.175	12.700	24.613	50.033
	3.683	6.666	12.529	23.328	50.665
	3.757	6.186	12.113	24.534	50.275
	3.113	6.203	12.392	25.269	49.895
\bar{X}	3.187	6.625	12.468	24.335	50.252
E%	1.98	6	-0.26	-2.66	0.50
s	0.574	0.432	0.228	0.736	0.302
cv%	18.00	6.53	8.02	3.02	0.60

Validación de la metodología analítica correspondiente a los replicados interdía para la CNV 8802.

CUADRO X

3.2. ESTUDIO DE LAS VARIACIONES DE VOLUMEN DE LA SOLUCION MEDICAMENTOSA.

De acuerdo con lo expuesto en el capítulo 2º, las variaciones de volumen de la solución medicamentosa en el transcurso de la experiencia, se han estudiado utilizando dos metódicas: mediante marcadores radiactivos y por estimación directa.

3.2.1. TECNICAS RADIATIVAS.

En el CUADRO XI se detallan los valores de las cantidades obtenidas de ^{14}C -PEG 4000, expresadas en d.p.m., en el circuito de perfusión a cada uno de los tiempos de toma de muestra, tanto individuales como promedias acompañadas de su desviación estándar. En la última columna del CUADRO XI, se consigna el valor hallado en el homogeneizado intestinal obtenido tras finalizar la experiencia. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto en nuestras condiciones experimentales, la desaparición del marcador en el transcurso de la experiencia.

3.2.2. METODO DIRECTO.

En los CUADROS XII al XVI se detallan las variaciones de volumen correspondiente a la solución medicamentosa dentro del circuito de perfusión para cada uno de los fármacos sometidos a estudio. En cada caso se consignan los valores representativos del volumen de las muestras tomadas (V_m), de la diferencia entre el volumen inicial y final ($V_0 - V_t$), del volumen final total ($V_f T$) y de la variación de volumen real (VVR). Para todos los valores se consigna además su valor medio acompañado de su desviación estándar.

De acuerdo con los resultados obtenidos, en todos los casos, las variaciones de volumen real de la solución medicamentosa en el circuito de perfusión no fueron superiores al 5% del total circulante.

RATA	1	2	3	4	5	MEDIA±ES	MUESTRA HOMOGEN INTEST.
PESO(g)	190	200	210	185	205		
TIEMPO(min)	DESINTEGRACIONES POR MINUTO (d.p.m.)						
0	5852.7	5852.7	5927.1	5685.3	4532.0	5569.96 ± 262.50	
15	5302.2	5448.7	5701.2	4955.8	5013.8	5284.34 ± 138.24	
30	5006.0	5349.0	5667.4	5220.0	4725.1	5193.50 ± 158.75	
45	4921.0	5175.8	5327.0	5178.6	4640.5	5048.58 ± 121.12	603.6
60	4982.5	5084.3	5593.9	5046.7	---	5176.85 ± 140.59	
75	4914.1	5101.7	5338.8	5085.8	---	5110.10 ± 87.26	
90	4779.7	4920.4	4100.5	5099.6	---	4725.05 ± 218.23	

Valores de d.p.m. correspondientes al polietilenglicol ¹⁴C estimado en el circuito de perfusión a los tiempos prefijados y en homogenizado del órgano (última columna).

CUADRO XI

RATA	1	2	3	4	5	VOLUMEN MEDIO \pm DS	
PESO (g)	195	210	220	180	160		
t (min)	VOLUMENES EXPERIMENTALES (ml)						
0	29.5	30	25	30	27	28.3	\pm 2.22
15	29.5	32	30	30	30	30.3	\pm 0.97
30	29.5	31	29	30	31	30.1	\pm 0.89
45	29	31	28.8	27	29.5	29.58	\pm 1.25
60	29	29.5	27	26	28	27.9	\pm 1.43
75	28	29.5	26.5	26	27	27.4	\pm 1.39
90	28	29	26.5	25.5	26	27	\pm 1.46
105	--	28.5	26.5	25	25.5	26.37	\pm 1.55
120	--	28	--	24.5	--	26.25	\pm 2.47
V_m	1.5	2.4	2.1	2.4	2.1	2.1	\pm 0.37
$V_o - V_t$	1.5	4	3.5	5.5	5.5	4	\pm 1.66
V_f	42	45	45.5	44	44	44.1	\pm 1.34
$V_f \cdot T$	43.5	47.4	47.6	46.4	46.1	46.24	\pm 1.56
VVR	0	1.6	1.4	3.1	3.4	1.9	\pm 1.38

Variaciones de volumen en la solución medicamentosa de NORFLOXACINA en el transcurso de la experiencia.

CUADRO XII

RATA	1	2	3	4	5	VOLUMEN MEDIO \pm DS	
PESO (g)	180	200	180	250	300		
t (min)	VOLUMENES EXPERIMENTALES (ml)						
0	30	27	26	26	25	26.8	\pm 1.92
15	32	28	30	29	27.5	29.3	\pm 1.79
30	32.5	30.5	32	32	28.5	31.1	\pm 1.63
45	32	31	32.5	32	29.5	31.4	\pm 1.19
60	31.5	31	32	31.5	29.5	31.1	\pm 0.96
75	30	30	31	32	30	30.6	\pm 0.89
90	29	29.5	30	32	29.5	30	\pm 1.17
105	27.5	29	29	31	28	28.9	\pm 1.34
120	--	28.5	--	29	27.5	28.33	\pm 0.76
V_m	2.1	2.4	2.1	2.4	2.4	2.28	\pm 0.16
$V_o - V_t$	5	2.5	5.6	3	2.5	3.72	\pm 1.47
V_f	44.5	48.5	48	48.5	47.5	47.4	\pm 1.67
$V_f \cdot T$	46.6	50.9	50.1	50.9	49.9	49.68	\pm 1.78
VVR	2.9	0.1	3.5	0.6	0.1	1.44	\pm 1.63

Variaciones de volumen en la solución medicamentosa de CIPROFLOXACINA en el transcurso de la experiencia.

CUADRO XIII

RATA	1	2	3	4	5	VOLUMEN MEDIO \pm DS	
PESO (g)	200	170	190	180	180		
t (min)	VOLUMENES EXPERIMENTALES (ml)						
0	27	28	28	27	29	27.8	\pm 0.84
15	30.5	30	34	29.5	31	31	\pm 1.77
30	33	29.5	34.5	30.5	32	31.9	\pm 1.98
45	32.5	28	35	30	32	31.5	\pm 2.64
60	33	28	35	29.5	32	31.5	\pm 2.78
75	32.5	27.5	35	28.5	31.5	31	\pm 3.04
90	32	27	34	28	31	30.4	\pm 2.88
105	31	26.5	--	27.5	30	28.75	\pm 2.10
120	30.5	25	--	27	29	27.87	\pm 2.39
V_m	2.4	2.4	1.8	2.4	2.4	2.28	\pm 0.27
$V_o - V_t$	2.5	5	1	3.5	3	3	\pm 1.46
V_f	47	45	48	44.5	45.5	46	\pm 1.46
$V_f \cdot T$	49.4	47.4	49.8	46.9	47.9	48.28	\pm 1.26
VVR	0.1	2.6	-0.8	1.1	0.6	0.72	\pm 1.26

Variaciones de volumen en la solución medicamentosa de PEFLOXACINA en el transcurso de la experiencia.

CUADRO XIV

RATA	1	2	3	4	5	VOLUMEN MEDIO \pm DS		
PESO (g)	160	240	260	290	350			
t (min)	VOLUMENES EXPERIMENTALES (ml)							
0	29	29	28	29	25	28	\pm 1.73	
15	32	33.5	32.5	32	28.5	31.7	\pm 1.89	
30	31.5	33.5	34	33.5	31	32.7	\pm 1.35	
45	30.5	35	34	33.5	32	33	\pm 1.77	
60	29.5	35.5	34.5	33	31	32.7	\pm 2.46	
75	27.5	35.5	33.9	31.5	29	31.48	\pm 3.32	
90	27.5	34.5	33	31	27.5	30.7	\pm 3.17	
105	27	34.5	32	30.5	26	30	\pm 3.52	
120	29.5	34	31	29.5	25.5	29.9	\pm 3.07	
V_m	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4		
$V_o - V_t$	5	1.5	3.5	4	6.5	4.1	\pm 1.85	
V_f	47	48.5	46.5	46.5	47	47.1	\pm 0.82	
$V_f \cdot T$	49.4	50.9	48.9	48.9	49.4	49.5	\pm 0.82	
VVR	2.6	-0.9	1.1	1.6	4.1	1.7	\pm 1.85	

Variaciones de volumen en la solución medicamentosa de la quinolona CNV 8804 en el transcurso de la experiencia.

CUADRO XV

RATA	1	2	3	4	5	VOLUMEN MEDIO \pm DS	
PESO (g)	160	160	160	180	160		
t (min)	VOLUMENES EXPERIMENTALES (ml)						
0	31	27	26	30	30	28.8	\pm 2.17
15	31	30	32	31.5	32	31.3	\pm 0.84
30	31	30	33	31.5	33	31.7	\pm 1.30
45	31	31	33.5	32.5	33	32.2	\pm 1.15
60	32	31	33.5	32.5	33	32.4	\pm 0.96
75	31	31	33	31	32	31.6	\pm 0.89
90	30.5	30	32	30	32	30.9	\pm 1.02
105	30	29.5	32	29	29.5	30	\pm 1.17
120	29.5	29	31.5	28	28	29.2	\pm 1.44
V_m	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	
$V_o - V_t$	2.5	2	2	4.5	4.9	3.18	\pm 1.41
V_f	45	48	46	46	45	46	\pm 1.22
$V_f \cdot T$	47.4	50.4	48.4	48.4	47.4	48.4	\pm 1.22
VVR	0.1	-0.4	-0.4	2.1	2.5	0.78	\pm 1.41

Variaciones de volumen en la solución medicamentosa de la quinolona CNV 8802 en el transcurso de la experiencia.

CUADRO XVI

3.3. ESTIMACION DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ABSORCION.

La constante de velocidad de absorción, de acuerdo con lo expuesto en el epígrafe 2.3., se ha calculado a partir de las concentraciones de fármaco obtenidas por HPLC de las muestras correspondientes a cada tiempo, representativas de las concentraciones de fluoquinolona remanente en el circuito de perfusión.

3.3.1. CONCENTRACIONES REMANENTES EN EL CIRCUITO DE PERFUSION.

Las concentraciones remanentes en el circuito de perfusión de cada uno de los fármacos sometidos a estudio se exponen en los CUADROS XVII a XXI. En ellos se consignan las concentraciones individuales correspondientes a cada rata y tiempo de toma de muestra, así como, los valores medios acompañados de sus desviaciones estándar.

También se concreta en cada uno de los CUADROS la expresión matemática de la recta de calibrado correspondiente, conjuntamente con el valor del coeficiente de correlación.

Las representaciones gráficas de los valores medios de las concentraciones frente al tiempo, se exponen en las FIGURAS 1 a 5.

3.3.2. CALCULO DE LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ABSORCION.

Las expresiones matemáticas representativas de la regresión lineal entre concentraciones remanentes de fármaco en el circuito de perfusión y el tiempo de toma de muestras, correspondientes a cada animal de experimentación dentro de cada fluoquinolona estudiada, se consignan en los CUADROS XXII a XXVI. En cada CUADRO se concreta el coeficiente de correlación para cada ecuación así como, del valor individual de la constante de velocidad de absorción y su valor promedio acompañado de la desviación estándar.

RATA	PESO (g)	TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA (minutos)									
		15	30	45	60	75	90	105	120		
1	195	16.638	15.984	15.876	15.571	15.234	15.300	--	--	--	--
2	210	15.614	14.442	12.191	13.289	12.715	8.761	8.303	--	--	--
3	220	14.659	14.622	--	12.699	--	11.755	11.452	--	--	--
4	180	14.881	15.068	14.834	13.956	13.700	11.424	11.308	--	--	--
5	160	13.075	13.771	12.553	10.934	--	9.086	--	--	--	7.922
m		14.973	14.777	13.863	13.290	13.883	11.265	10.354	7.922		
s		1.313	0.820	1.780	1.699	1.269	2.625	1.778			
Ecuación recta de calibrado:		$y = 0.0531 \cdot x + 0.7043 ; r=0.9999$									

Concentraciones remanentes en $\mu\text{g/ml}$ de NORFLOXACINA en el circuito de perfusión a los tiempos de toma de muestra estimadas por HPLC.

CUADRO XVII

RATA	PESO (g)	TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA (minutos)									
		15	30	45	60	75	90	105	120		
1	180	15.257	15.454	15.411	13.798	13.662	12.664	12.497	--	--	
2	200	12.840	12.945	11.993	11.476	10.319	10.042	9.273	9.952	9.952	
3	180	14.750	13.037	13.117	11.032	11.374	10.465	10.207	--	--	
4	250	14.779	11.961	10.819	10.621	9.456	9.392	9.175	7.446	7.446	
5	300	13.968	14.448	13.040	12.526	11.551	10.237	9.988	9.713	9.713	
m		14.319	13.569	12.876	11.891	11.272	10.560	10.228	9.037	9.037	
s		0.947	1.377	1.697	1.281	1.582	1.242	1.344	1.388	1.388	
Ecuación recta de calibrado:		$Y = 0.0704 \cdot x + 0.9999 ; r=0.9999$									

Concentraciones remanentes en $\mu\text{g/ml}$ de CIPROFLOXACINA en el circuito de perfusión a los tiempos de toma de muestra estimadas por HPLC.

CUADRO XVIII

RATA	PESO (g)	TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA (minutos)									
		15	30	45	60	75	90	105	120		
1	200	14.611	14.630	12.842	12.704	11.812	11.534	11.436	11.041		
2	170	15.684	13.517	13.403	13.438	13.293	12.676	11.957	11.495		
3	190	14.382	13.863	13.420	11.932	12.013	11.673	--	--		
4	180	14.422	13.807	13.739	12.757	13.226	11.781	12.489	11.283		
5	180	14.495	14.391	13.293	13.176	12.710	12.938	12.625	12.473		
m		14.719	14.042	13.339	12.801	12.611	12.120	12.127	11.573		
s		0.546	0.456	0.324	0.573	0.680	0.640	0.543	0.628		
Ecuación recta de calibrado:		$Y = 0.0454 \cdot x + 0.7117 ; r=0.9999$									

Concentraciones remanentes en $\mu\text{g/ml}$ de PEFLOXACINA en el circuito de perfusión a los tiempos de toma de muestra estimadas por HPLC.

CUADRO XIX

RATA	PESO (g)	TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA (minutos)									
		15	30	45	60	75	90	105	120		
1	160	12.155	10.713	10.508	10.299	8.460	7.735	--	6.875		
2	240	12.374	11.948	11.042	9.791	9.166	8.322	8.677	--		
3	260	14.255	13.189	12.388	11.666	8.975	8.917	8.191	7.867		
4	290	13.122	11.638	9.782	9.355	8.152	6.814	6.474	--		
5	350	--	9.201	8.311	6.860	7.124	--	5.661	5.491		
m		12.976	11.338	10.406	9.594	8.375	7.947	7.251	6.744		
s		0.947	1.487	1.510	1.758	0.807	0.896	1.420	1.193		
Ecuación recta de calibrado:		$Y = 0.1051 \cdot X + 1.8674 ; r = 0.9997$									

Concentraciones remanentes en $\mu\text{g/ml}$ de CNV 8804 en el circuito de perfusión a los tiempos de toma de muestra estimadas por HPLC.

CUADRO XX

RATA	PESO (g)	TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA (minutos)									
		15	30	45	60	75	90	105	120		
1	160	14.744	--	13.536	13.385	11.903	10.874	10.584	--		
2	160	14.610	14.748	11.491	--	11.017	10.454	10.083	--		
3	160	14.477	13.313	13.137	12.356	--	12.078	--	11.043		
4	180	13.765	13.608	13.227	12.693	12.320	12.238	11.766	--		
5	160	15.103	14.226	12.434	12.698	--	11.801	11.003	--		
m		14.540	13.974	12.765	12.783	11.747	11.489	10.859	11.043		
s		0.492	0.641	0.818	0.432	0.665	0.783	0.712			
Ecuación recta de calibrado:		$Y = 0.0826 \cdot X + 0.9254 ; r=0.9997$									

Concentraciones remanentes en $\mu\text{g/ml}$ de CNV 8802 en el circuito de perfusión a los tiempos de toma de muestra estimadas por HPLC.

CUADRO XXI

ABSORCION IN SITU NORFLOXACINO

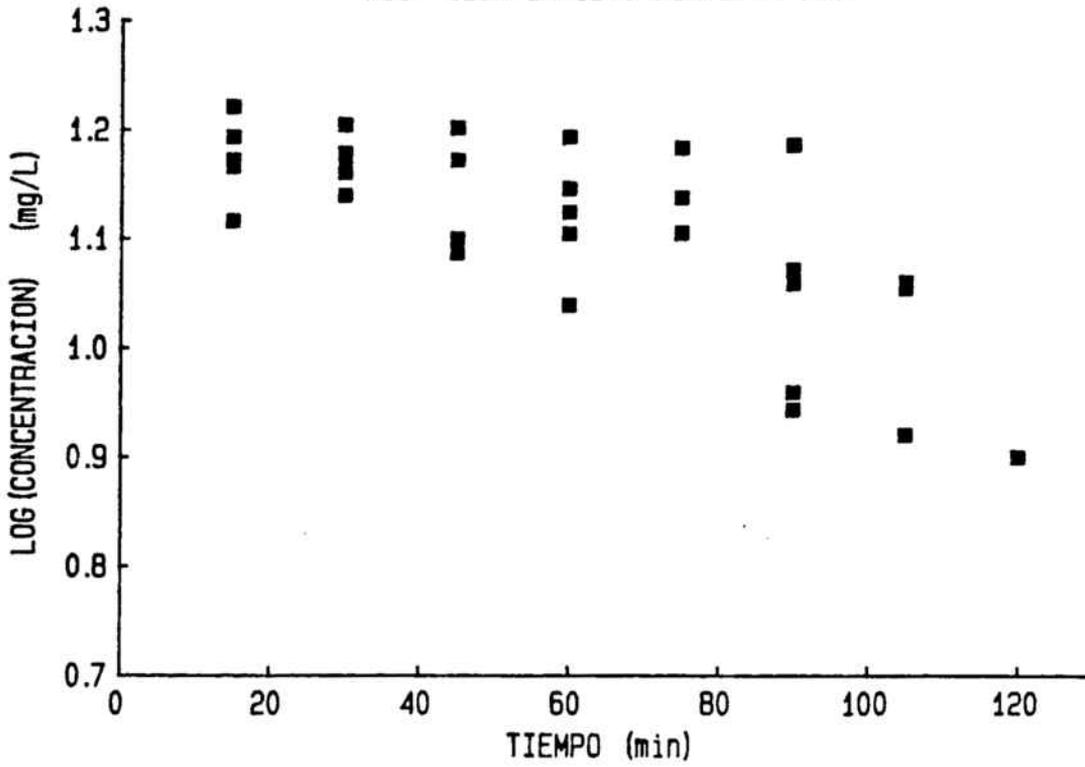


FIGURA 1

ABSORCION IN SITU CIPROFLOXACINO

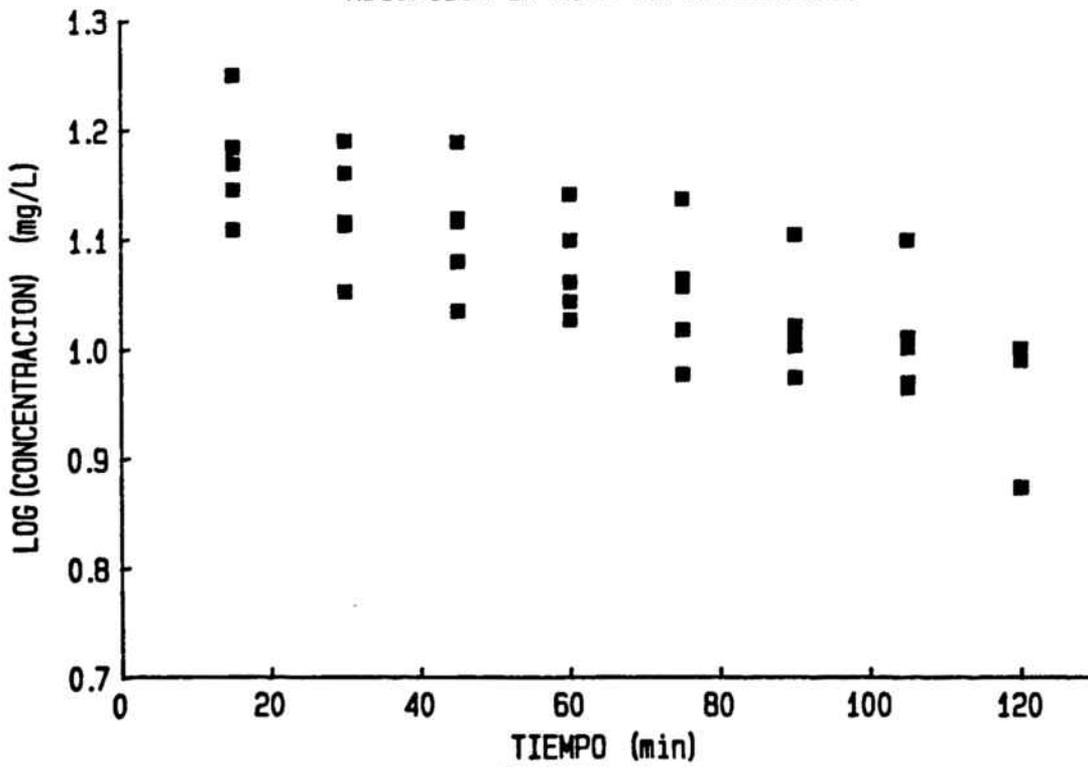


FIGURA 2

ABSORCION IN SITU PEFLOXACINO

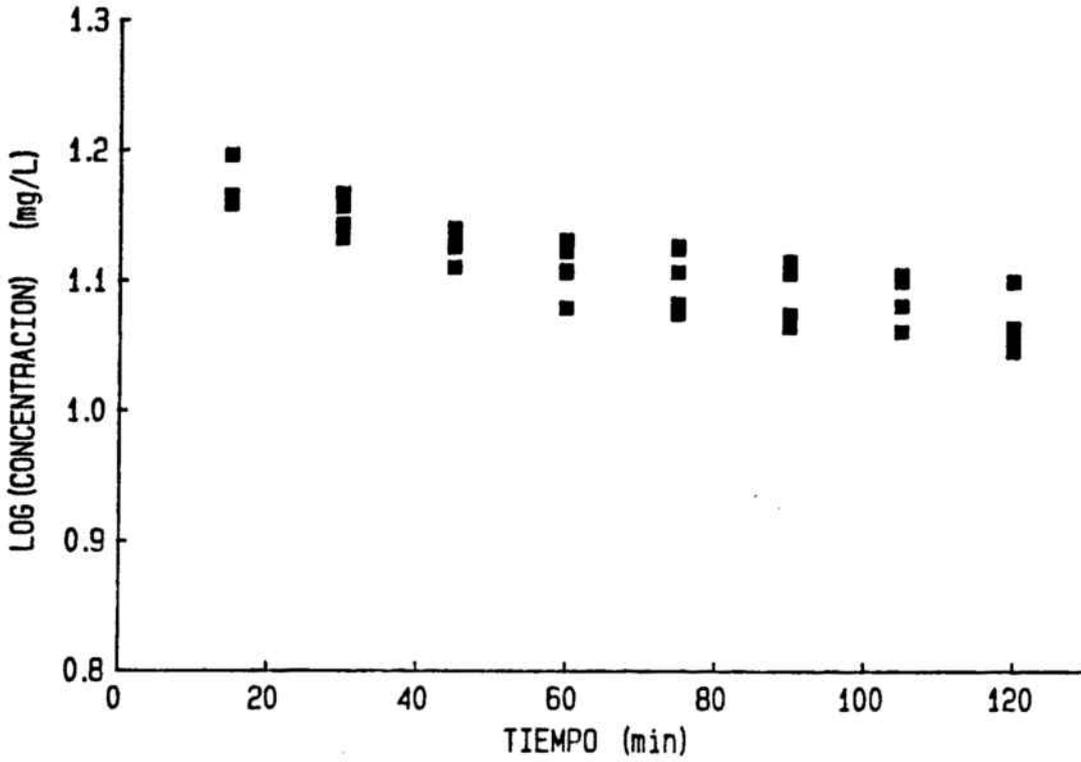


FIGURA 3

ABSORCION IN SITU CV-8804

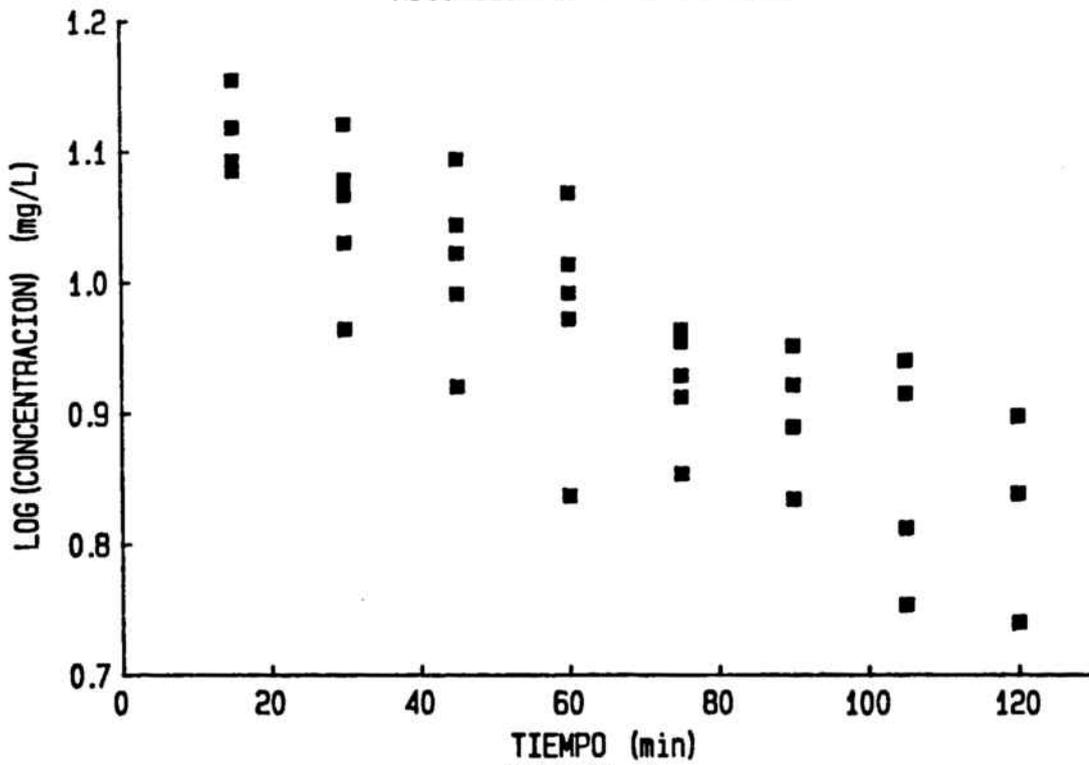


FIGURA 4

ABSORCION IN SITU CV-8802

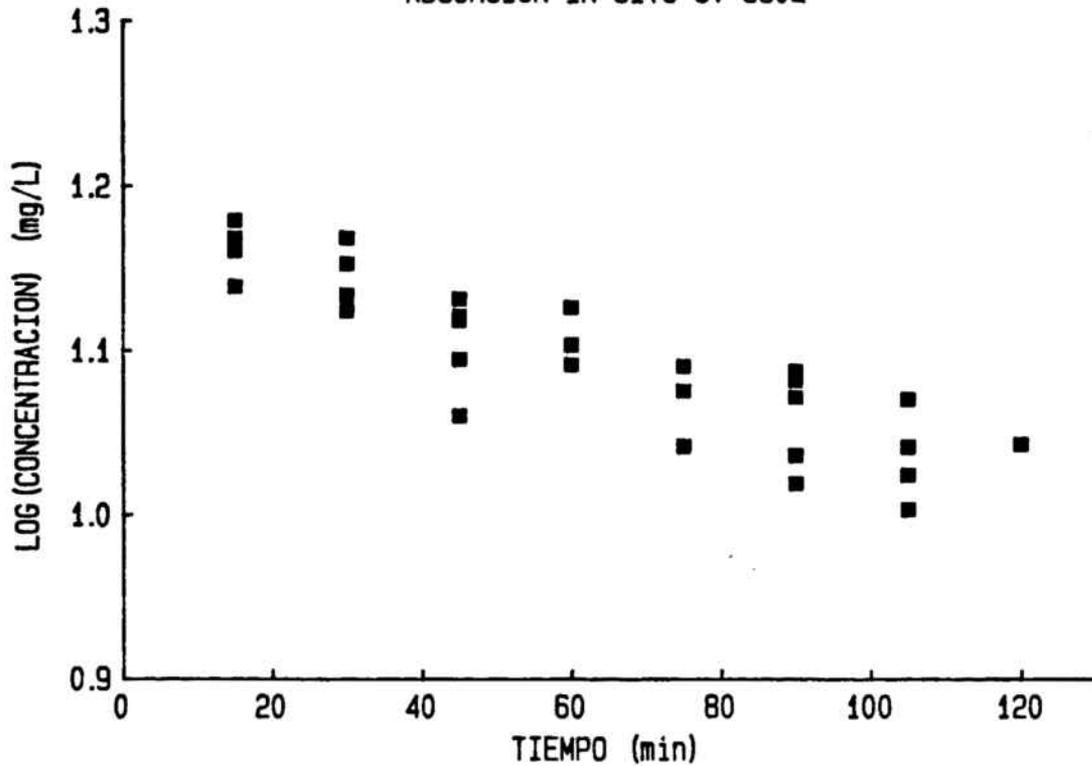


FIGURA 5

RATA	ECUACIONES RECTAS DE REGRESION	COEFICIENTE DE CORRELACION	k_a ($\text{min}^{-1} \cdot 10^3$)
1	$\ln C = -0.00111 \cdot t + 2.8157$	0.9505	1.11
2	$\ln C = -0.00679 \cdot t + 2.8839$	0.9088	6.79
3	$\ln C = -0.00314 \cdot t + 2.7477$	0.9869	3.14
4	$\ln C = -0.00347 \cdot t + 2.8115$	0.9125	3.47
5	$\ln C = -0.00548 \cdot t + 2.7273$	0.9436	5.48
CONSTANTE DE ABSORCION PROMEDIO \pm DS			3.99 ± 2.19

Constantes de absorción (k_a) individuales de NORFLOXACINA en las 5 ratas ensayadas, calculadas a partir de las ecuaciones representativas de la absorción intestinal "in situ".

CUADRO XXII

RATA	ECUACIONES RECTAS DE REGRESION	COEFICIENTE DE CORRELACION	$(\text{min}^{-1} \cdot k_a \cdot 10^3)$
1	$\ln C = -0.00266 \cdot t \pm 2.8026$	0.9440	2.66
2	$\ln C = -0.00389 \cdot t \pm 2.6486$	0.9808	3.89
3	$\ln C = -0.00417 \cdot t \pm 2.7242$	0.9576	4.17
4	$\ln C = -0.00529 \cdot t \pm 2.6857$	0.9541	5.29
5	$\ln C = -0.00424 \cdot t \pm 2.7528$	0.9762	4.24
CONSTANTE DE ABSORCION PROMEDIO \pm DS			4.05 \pm 0.941

Constantes de absorción (k_a) individuales de CIPROFLOXACINA en las 5 ratas ensayadas, calculadas a partir de las ecuaciones representativas de la absorción intestinal "in situ".

CUADRO XXIII

RATA	ECUACIONES RECTAS DE REGRESION	COEFICIENTE DE CORRELACION	$(\text{min}^{-1} \cdot k_a \cdot 10^3)$
1	$\ln C = -0.00284 \cdot t \pm 2.7187$	0.9603	2.84
2	$\ln C = -0.00241 \cdot t \pm 2.7363$	0.9221	2.41
3	$\ln C = -0.00303 \cdot t \pm 2.7114$	0.9556	3.03
4	$\ln C = -0.00209 \cdot t \pm 2.6988$	0.9219	2.09
5	$\ln C = -0.00144 \cdot t \pm 2.6811$	0.9233	1.44
CONSTANTE DE ABSORCION PROMEDIO \pm DS			2.36 \pm 0.633

Constantes de absorción (k_a) individuales de PEFLOXACINA en las 5 ratas ensayadas, calculadas a partir de las ecuaciones representativas de la absorción intestinal "in situ".

CUADRO XXIV

RATA	ECUACIONES RECTAS DE REGRESION	COEFICIENTE DE CORRELACION	$(\text{min}^{-1} \cdot k_a \cdot 10^3)$
1	$\ln C = -0.00552 \cdot t + 2.5806$	0.9765	5.52
2	$\ln C = -0.00469 \cdot t + 2.5926$	0.9687	4.69
3	$\ln C = -0.00618 \cdot t + 2.7621$	0.9752	6.18
4	$\ln C = -0.00803 \cdot t + 2.6860$	0.9928	8.03
5	$\ln C = -0.00571 \cdot t + 2.3578$	0.9707	5.71
CONSTANTE DE ABSORCION PROMEDIO \pm DS			6.03 \pm 1.24

Constantes de absorción (k_a) individuales de CNV 8804 en las 5 ratas ensayadas, calculadas a partir de las ecuaciones representativas de la absorción intestinal "in situ".

CUADRO XXV

RATA	ECUACIONES RECTAS DE REGRESION	COEFICIENTE DE CORRELACION	$(\text{min}^{-1} \cdot k_a \cdot 10^3)$
1	$\ln C = -0.00396 \cdot t + 2.7765$	0.9714	3.96
2	$\ln C = -0.00439 \cdot t + 2.7419$	0.9200	4.39
3	$\ln C = -0.00231 \cdot t + 2.6796$	0.9402	2.31
4	$\ln C = -0.00189 \cdot t + 2.6674$	0.9428	1.89
5	$\ln C = -0.00322 \cdot t + 2.7347$	0.9519	3.22
CONSTANTE DE ABSORCION PROMEDIO \pm SD			3.15 \pm 0.106

Constantes de absorción (k_a) individuales de CNV 8802 en las 5 ratas ensayadas, calculadas a partir de las ecuaciones representativas de la absorción intestinal "in situ".

CUADRO XXVI

3.4. ESTUDIO ESTADISTICO.

En el CUADRO XXVII se expone el resultado del análisis de la varianza de una vía (ANOVA), realizado entre los valores medios de las constantes de velocidad de absorción correspondientes a los fármacos estudiados.

Los resultados obtenidos tras aplicación del test de Peritz se detallan en el CUADRO XXVIII.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	G.L.	VARIANZA	F	P
Entre	37.362	4	9.340	5.312	0.00441
Dentro	35.166	20	1.758		
Total	72.528	24			

Análisis de la varianza correspondiente a la constante de absorción (k_a) de las fluoquinolonas estudiadas.

CUADRO XXVII

FARMACOS	Pefloxacina	CNV 8802
CNV8804	0.0042	0.0372

Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) tras la aplicación del test de Peritz entre las constantes de absorción de las fluoquinolonas.

CUADRO XXVIII

CAPITULO 4º

4. DISCUSION Y CONCLUSIONES

4.1. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

De acuerdo con lo expuesto en el motivo y plan de trabajo, en la presente Memoria se ha estudiado la velocidad de absorción intestinal en la rata anestesiada de una serie de fluoquinolonas estimando la constante de velocidad del proceso, supuesto de primer orden, mediante una técnica de perfusión. Una de las problemáticas que, en general, presenta la estimación de la constante de absorción k_a mediante técnicas de perfusión "in situ", es la frecuente aparición de variaciones de volumen de la solución medicamentosa, que se producen a lo largo de la experiencia en el compartimiento estanco que configura la zona de absorción. En nuestras condiciones experimentales, hemos puesto de manifiesto, en primer lugar, que la utilización de una sustancia marcada como el polietilenglicol ^{14}C , no es operativa para estudiar y cuantificar las variaciones de volumen citadas. Aunque en la bibliografía consultada (84, 85, 86, 87, 88) se preconiza la utilización de sustancias marcadoras para estudiar el fenómeno, basándose en la no absorbabilidad de las mismas, los estudios realizados en la presente Memoria confirman que, en nuestras condiciones experimentales, la cantidad de marcador que desaparece del lugar de absorción en función del tiempo representa un porcentaje apreciable, concretamente un aproximadamente 15.16% al final de esta experiencia (90 minutos); la desaparición del marcador de la zona de absorción puede deberse, probablemente, a uno u otro de los dos procesos siguientes: a una absorción del marcador a través de la membrana intestinal y/o a un proceso de adsorción del mismo en las paredes de la membrana, hecho éste que en la presente Memoria, se puede comprobar por medición de la radiactividad hallada en homogeneizado de intestino al finalizar la experiencia.

Todo ello confirma, el interés actual y el mostrado en experiencias anteriores (89) en el estudio de esta problemática; en este sentido, puede anticiparse que, la utilización de sustancias marcadoras para evaluar las variaciones de volumen de la solución medicamentosa en los estudios de absorción intestinal "in situ" no resultan, en general, muy fiables (81) y, en principio, debe desconfiarse de los denominados trazadores "no absorbibles". Por otra parte, el estudio de las variaciones de volumen, mediante el método directo utilizado en el presente trabajo, permite evidenciar el fenómeno de forma relativamente fiable y sencilla. Los resultados obtenidos en la presente Memoria, referentes al estudio de la absor-

ción intestinal de cinco fluoquinolonas concretan, en todos los casos, que las variaciones de volumen de la solución medicamentosa a lo largo de la experiencia no son superiores al 5%, por comparación, y de acuerdo con los datos contrastados de la bibliografía efectuadas (90), no se hace necesaria la corrección de los volúmenes, puesto que dichas variaciones, claramente inferiores al 10%, no tienen incidencia práctica en el valor final estimado para las constantes de velocidad de absorción intestinal de las fluoquinolonas de nuestro estudio.

En consecuencia, las constantes de absorción de primer orden se han calculado directamente a partir de las concentraciones remanentes de fármaco en el líquido de perfusión en cada tiempo, sin corrección alguna respecto a la variación de volumen intraluminal. Una de las razones que pudiera explicar que la variación de volumen sea, en nuestras condiciones experimentales relativamente pequeña, pudiera deberse a la modificación de la técnica usada en el presente trabajo, respecto a la original, en el sentido que la superficie externa del intestino delgado del animal en contacto con el medio ambiente es prácticamente nula, con lo cual, es más difícil la pérdida de líquido por evaporación.

En relación a los valores medios hallados para las constantes de velocidad de absorción intestinal, k_a , para las cinco fluoquinolonas estudiadas, el análisis estadístico llevado a cabo (ANOVA de una vía), pone de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($p=0.00441$) entre los valores estimados para este parámetro.

A fin de concretar entre qué pares de medias son significativas las diferencias, se aplicó a los resultados originales (valores de k_a individuales) el ensayo de comparación múltiple de Peritz (91) por ser, de acuerdo con la bibliografía, uno de los más robustos y fiables en este tipo de estudios. El resultado del estudio evidenció diferencias estadísticamente significativas sólo entre los valores medios de la constante de velocidad de absorción k_a de la pefloxacina y de la quinolona CNV 8804 ($p=0.0042$) y entre las fluoquinolonas CNV8802 y la CNV 8804 ($p=0.0372$).

Teniendo en cuenta la magnitud de los valores obtenidos para los valores medios de las constantes de velocidad de absorción intestinal de las cinco fluoquinolonas estudiadas (pefloxacina $2.362 \cdot 10^{-3}$, CNV 8802 $3.154 \cdot 10^{-3}$, norfloxacina $3.998 \cdot 10^{-3}$, ciprofloxacina $4.05 \cdot 10^{-3}$ y CNV 8804 $6.026 \cdot 10^{-3}$) puede afirmarse que la fluoquinolona CNV 8804 es la que presentó en nuestras condiciones experimentales, la constante de velocidad de absorción más elevada.

Por otro lado, en ensayos farmacológicos previos, se ha comprobado que la actividad antimicrobiana de la fluoquinolona CNV 8802 expresada en función de su MIC frente a 100

cepas de Escherichia coli (92) posee el mismo valor que la ciprofloxacina que resultó ser la fluoquinolona más activa de las estudiadas en la presente Memoria, según se detalla en el CUADRO I:

Compuestos	MIC ($\mu\text{g/l}$)
Ciprofloxacina	0.025
CNV 8802	0.025
Norfloxacina	0.100
Pefloxacina	0.100
CNV 8804	0.200

Valores del MIC para las fluoquinolonas estudiadas frente a E.coli.

CUADRO I

A la luz de los resultados obtenidos, en nuestras condiciones experimentales, que permiten afirmar que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los valores estimados para las constantes de velocidad de absorción correspondientes a la ciprofloxacina y a la fluoquinolona CNV 8802, ésta resulta, en principio, interesante para llevar a cabo con ella estudios de fase I y II como fármaco de potencial interés en el tratamiento de infecciones sistémicas producidas por gérmenes sensibles al quimioterápico.

4.2. CONCLUSIONES.

- 1.- Se estudia en la presente Memoria la absorción intestinal "in situ" en la rata anestesiada de una serie de fluoquinolonas mediante una técnica de perfusión. Las fluoquinolonas estudiadas han sido norfloxacina, ciprofloxacina, pefloxacina, CNV 8804 y CNV 8802. Las dos últimas no comercializadas y actualmente en fase de estudio para su potencial uso clínico.
- 2.- Se pone de manifiesto, que el polietilenglicol ^{14}C no es un buen trazador para estudiar las variaciones de volumen de la solución medicamentosa en el compartimiento estanco cuando se pretende evaluar la constante de velocidad de absorción de los fármacos por métodos directos, basándose en su inabsorbabilidad o, en otras palabras, que la concentración del trazador se mantiene constante a lo largo de la experiencia cuando permanece inalterado el volumen luminal. En nuestras condiciones experimentales el traza-

dor desaparece de la solución medicamentosa un 15.16% de la concentración inicial.

- 3.- La modificación realizada en la técnica biológica de perfusión desarrollada en la presente Memoria, permite que las variaciones de volumen de la solución medicamentosa en el compartimiento estanco sean mínimas, concretamente inferiores al 5%.
- 4.- Consecuencia de la conclusión anterior, las irrelevantes variaciones de volumen que sufre la solución medicamentosa, en nuestras condiciones experimentales, permite estimar los valores de la constante de velocidad de absorción sin necesidad de efectuar correcciones. Las variaciones de concentración que sufre el fármaco en el transcurso de la experiencia pueden considerarse atribuibles exclusivamente a la absorción del mismo.
- 5.- En función de la constante de absorción k_a obtenida, las fluoquinolonas podrían ordenarse de mayor a menor de acuerdo con la secuencia: CNV 8804, ciprofloxacina, norfloxacina, CNV 8802 y pefloxacina. Del estudio estadístico realizado (ANOVA seguido de ensayo de Peritz) se concluye que sólo se presentan diferencias estadísticamente significativas para los valores de las constantes de velocidad de absorción entre la quinolona CNV 8804 y la pefloxacina ($p=0.0042$) y entre la quinolona CNV 8804 y la CNV 8802 ($p=0.0372$).
- 6.- Si se considera la magnitud de los valores medios de la constante de velocidad de absorción de las cinco fluoquinolonas estudiadas, puede concluirse que la constante más elevada corresponde a la fluoquinolona CNV 8804 ($k_a=6.026 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$).
- 7.- Sin embargo, de acuerdo con ensayos farmacológicos previos que pusieron de manifiesto que el MIC más bajo frente a 100 cepas de Escherichia coli correspondía a la ciprofloxacina y a la fluoquinolona CNV 8802 y, no presentándose diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de k_a para estas quinolonas, se puede concluir que la fluoquinolona CNV 8802 es, en principio, la más interesante desde un punto de vista farmacológico y biofarmacéutico.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- SMITH J.T. "Awakening the slumbering potential of the 4-quinolone antibacterials". J. Pharmaceutical, 233, 299-305 (1984).
- 2.- "Clinical Pharmacokinetics of 4-quinolones". Clinical Pharmacokinetics, 14, 97-121 (1988).
- 3.- BRYSKIER A., CHANTOT J.F. "Classification and structure-activity relationships of pyridione- β -carboxylic and derivates. Abstract WS-9-4 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto" (1985).
- 4.- HAYAKAWA I., HIRAMITSU T., IMAMURA M., EBATA T., et al. "Structure-activity relationships of quinolone antibacterial agents including ofloxacin. Abstract. 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto" (1985).
- 5.- JACK D.B. "Recent advances in pharmaceutical chemistry: the 4-quinolone antibiotics". Journal of Clinical and Hospital Pharmacy, 11,75-93 (1987).
- 6.- JANKNEGT R. "Fluorinated quinolones: a review of their mode of action, antimicrobial activity, pharmacokinetics and clinical efficacy". Pharmaceutisch Weehblad-Scientific Edition 8: 1-21 (1986).
- 7.- Panorama Actual del Medicamento, 118, vol. 12, 354-355 (1988).
- 8.- SMITH J.T., RATCLIFFE N.T. "Einfluss von pH-Wert und magnesium auf die antibakterielle Aktivität von Chinolonpräparaten". Infection 14 (Suppl. 1), 31-33 (1986).
- 9.- CUELLAR S. "Evaluación empírica de fluoquinolonas". Industria Farmacéutica, Sept./Oct. 67-75 (1988).
- 10.- HOOPER D.C., WOLFSON J.S., SOUZA K.S., TUNG C., MCHUGH G.L. "Resistance in Escherichia coli". Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 29, 639-644 (1986).
- 11.- SATO K., INOUE Y., FUJII T., AOYAMA H., INOUE M. "Purification and properties of DNA gyrase from a fluoquinolone-resistant strain of Escherichia coli". Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 30, 777-780 (1986).
- 12.- SMITH J.T. "The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance". Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 18 (Suppl. D), 21-29 (1986).
- 13.- SMITH J.T., RATCLIFFE N.T. "Ciprofloxacin and ofloxacin

posses and extra bactericidal action absent from other 4-qui- nolone antibacterial agents". 24th Inter-Science Conference an Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington D.C. 1984, pp. 45-50, Excerpta Medica. Tokyo 1985.

- 14.- MONK J.P., CAMPOLI-RICHARDS D.M. "Ofloxacin: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use". *Drugs* 33, 346-391 (1987).
- 15.- ZWEERINK M.M., EDISON A. "Inhibition of micrococcus DNA-gyrase by norfloxacin and 10 other quinolone carboxilic acids". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29-59-63 (1986).
- 16.- CAMPOS P., VERA A., MATIN-LUENGO F. "Isolation of mutants of Pseudomonas aeruginosa PA01 resistant to ciprofloxacin, norfloxacin and ofloxacin and incomplete cross-resistance with nalidixic acid". Abstract P-37-81. 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto (1985).
- 17.- COURVALIN P., DERLOT E., CHABBERT Y.A. "Growth deficiency of quinolone-resistant mutants". Abstract S-31-7. 14th International Congress of Chemotherapy, Kyoto (1985).
- 18.- HOOPER D.C., WOLFSON J.S. "The fluoquinolones: pharmacology clinical uses and toxicities in humans". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28, 716-721 (1985).
- 19.- Le Bel M. "Pharmacokinetics of oral fluoquinolones". *ISI Atlas of Science: Pharmacology*, 196-201 (1988).
- 20.- HOLMES B., BROGDEN R.N., RICHARDS D.M. "Norfloxacin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics properties and therapeutic use". *Drugs*, 30, 482-513 (1985).
- 21.- DRUSANO G.L., STANDIFORD H.C., PLAISANCE K., FORREST A., LESLIE J. "Absolute oral bioavailability of ciprofloxacin". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30, 444-446 (1986).
- 22.- SORGEL F., JAEHDE U., NABER K., STEPHAN U. "Pharmacokinetic Disposition of Quinolones in human body fluids and Tissues". *Clinical Pharmacokinetics* 16 (Suppl. 1), 5-24 (1989).
- 23.- LOCKLEY M.R., WISE R., DENT J. "The pharmacokinetics and tissue penetration of ofloxacin". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 14, 647-652 (1984).
- 24.- WISE R., LOCKLEY M.R., DENT J., WEBBERLEY M. "Pharmacokinetics and tissue penetration of enoxacin". *Antimicrobial*

Agents and Chemotherapy, 26, 17-19 (1984).

- 25.- WISE R., LISTER D., McNULTY C., GRIGGS D., ANDREWS J.M. "The comparative pharmacokinetics of five quinolones". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 8 (Suppl. D), 71-81 (1986).
- 26.- GILFILLAN E.C., PELAK B.A., BLAND L.A., MALATESTA P.F., GADEBUSCH H.H. "Pharmacokinetic studies of norfloxacin in laboratory animals". *Chemotherapy*, 30, 288-296 (1984).
- 27.- BARRE J., HOUIN G., TILLEMENT J.P. "Dose-dependant pharmacokinetics study of pefloxacin, a new antibacterial agent in humans". *J. Pharm. Sci.* 73, 1379-1382 (1984).
- 28.- LEROY A., BORSA F., HUMBERT G., BERNADET P., FILLASTRE J.P. "The pharmacokinetics of ofloxacin in healthy adult male volunteers". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 31, 629-630 (1987).
- 29.- SHAH P.M. "Effect of co-medication on absorption of ciprofloxacin from gastro-intestinal tract". *Quinolones Bulletin* 2, 12 (1986).
- 30.- HOFFKEN G., BORNER K., GLATZEL P.D., KOEPPE P., LODE H. "Reduced enteral absorption of ciprofloxacin in the presence of antiacids". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 4, 345-347 (1985).
- 31.- HOFFKEN G., LODE H., OLSCHESKI P., SIEVERS B., BORNER K., KOEPPE P. "Interaktionen in der gastrointestinalen resorption von ofloxacin". *Wiesbaden Klin. Wochenschrift*, 64-162-165 (1986).
- 32.- RATCLIFE N.T., SMITH J.T. "Effects of magnesium on the activity of 4-quinolone antibacterial agents". *British J. Clin. Pharmacol.* 61-63 (1980).
- 33.- STAHL J.P., CROIZE J., AKBARAL J.P. "Diffusion of ofloxacin into cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis". *Infection*, 18 (Suppl. 4), 256-258 (1986).
- 34.- VALAINIS G., THOMAS D., PANKEY G. "Penetration of ciprofloxacin into cerebrospinal fluid". *Eur. J. Clin. Microbiol.* 5, 206-207 (1986).
- 35.- WOLFF M., REGINIER B., DALDOSS C. "Penetration of pefloxacin into cerebrospinal fluid of patients with meningitis". *Antimicrob. Agents Chemother.* 26, 289-291 (1984).
- 36.- GRUBER G., JAEDHE U., SÖRGEL F., HEISS R., SCHUNAK W. "Relationships between the chemical structure and the HPLC capacity factor of gyrase inhibitors and their

- metabolites in different methanol-water eluents". *Frese-
nius Zeitschrift für Analytische Chemie*, 330, 338-339
(1988).
- 37.- WHITE L.O. "Metabolism of 4-Quinolones". *Quinolones Bull.*
3, 1-4 (1987).
- 38.- MONSTAY G., GOUEFFON Y., ROQUET F. "Absorption, distribu-
tion metabolic fate and eliminatio of pefloxacin mesylate
in mice, rats, dogs, monkeys and humans". *Antimicrob.*
Agents Chemother. 25, 463-472 (1984).
- 39.- BEERMAN D., SCHOLL H., WINGENDER W., FORSTER D. "Metabo-
lism of ciprofloxacin in man". 1st International Ciproflo-
xacin Workshop, 1985, pp. 141-146. *Experta Medica.* Ams-
terdam.
- 40.- BORNER K., HOFFKEN G., LODE H., PRINZING G., LODE R.
"Remote Ausscheidung von Ciprofloxacin und einigen meta-
boliten nach einmaliger Oraler oder Intravenöser Applika-
tion von 50 mg". *Fortschritte der Antimikrobiellen Chemot-*
herapie, 3-5, 695-699 (1984).
- 41.- JOHNSON M., BENZIGER D. "Metabolism and disposition of
amifloxacin in laboratory animals". *Antimicrobial Agents*
and Chemotherapy, 27, 774-781 (1985).
- 42.- LOGEMANN C., OHNHAUS E.E. "Enoxacin, a diferential inhi-
bitor of the microsomal liner enzyme system in men". 26th
Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Che-
motherapy. New Orleans 1986. Abstract N^o 481, p. 185
(1986).
- 43.- JAEHDE U., MAHR G., ZÜRCHER J., NABER K., SCHUNACK W.
"Absolute bioavailability, distribution and metabolism of
enoxacin in healthy volunteers". 89th Annual Meeting
ASCPT. San Diego. March. 9-11, 1988. Abstract PII 6-7.
Clinical Pharmacology and Therapeutics, 43, 157 (1988).
- 44.- SÖGEL F., MAHR G., KOCH H.U., STEPHAN U. WIESEMANN H.G.
"Effects of cimetidine on the pharmacokinetics of peflo-
xacin in healthy volunteers". *Reviews of Infections*
Diseases 10 (Suppl. 1) S137 (1988).
- 45.- SÖRGEL F., KOCH H.U., MALTER U., METZ R., MAHR G. "Meta-
bolism of pefloxacin in humans". *Reviews of Infections*
Diseases 10 (Suppl. 1) S95-S96 (1988).
- 46.- LODE H., HÖFFKEN G., OLSCHESKI P., SIEVERS B., KIRCH A.
"Pharmacokinetics of ofloxacin after parenteral and oral
administration". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,
31, 1338-1342 (1987).
- 47.- KLINGE E., MANNISTO P.T., MANTYLA R., MATTILA J., HÄNNI-

- NEN U. "Single and multiple-dose pharmacokinetics of piperimidic and in normal human volunteers". Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 26, 69-73 (1984).
- 48.- JAEHDE U., MALTER U., SÖRGEL F., GOTTSCHALK B., WEISEMANN H. "Individual factors affecting in pharmacokinetics of pefloxacin. Proceedings of the 15th International Congress of Chemotherapy. Istanbul, July 19-24. 1987. In Bekarda and Kuemmerle (Eds.). Progress and antimicrobial and anticancer chemotherapy. Vol. I, 883-885. Ecomed-Verlag. Landsberg (1987).
- 49.- BERGAN T. "Dose regimens of quinolones in reduced renal funtion". Quinolones Bull. 2, 7-10 (1986).
- 50.- SINGLAS E., TABURET A.M., LANDRU I., ALBIN H., RYCKELINK J. "Pharmacokinetics of ciprofloxacin tablets in renal failure: influence of haemodialysis". European Journal of Clinical Pharmacology, 31, 589-593 (1987).
- 51.- MATSUMOTO R. "Pharmacokinetics of ciprofloxacin in humans and animals". Abstract WS-6-5. 14th International Congress of Chemotherapy. Kyoto (1985).
- 52.- WINGENDER W., BEERMAN D., FÖESTER D., GRAEFE K.H., SCHA-CHT P. "Mechanism of renal excretion of ciprofloxacin, a new quinolone carboxilic acid derivate, in humans". Proceedings of the 4th Mediterranean Congress of Chemotherapy. Rhodos 1984. Chemotherapia 4 (Suppl.), 403-404 (1985).
- 53.- Le Bel M. "Ciprofloxacin: chemistry, mechanism of action, resistance, antimicrobial spectrum, phamacokinetics, clinical trials and adverse reactions". Pharmacotherapy, 8, 3-30 (1988).
- 54.- SHAEFFAER A.J. "Multiclinic study of norfloxacin for treatment of urinary tract infections". Am. J. Med. 82 (6B), 53-58 (1987).
- 55.- WILLIAMS A.H., GRUNEBERG R.N. "Ciprofloxacin and cotrimoxazole in urinary tract infection". J. Antimicrob. Chemother. 18 (Suppl. D), 107-110 (1986).
- 56.- COX C.E., McCABE R.E., GRAD C. "Oral norfloxacin vs. parenteral treatment of nosocomial urinary tract infections". Am. J. Med. 82 (6B), 59-64 (1987).
- 57.- LEIGH D.A., EMMANUEL F.X.S. "The treatment of P. aeruginosa urinary tract infections with norfloxacin". J. Antimicrob. Agents, 13 (Suppl. B), 85-88 (1984).
- 58.- WEIDNER W., SCHIEFER H.G., DALHOFF A. "Treatment of

- chronic bacterial prostatitis with ciprofloxacin: Results of a one-year follow-up study". Am. J. Med. 82 (4A), 280-283 (1987).
- 59.- CRIDER S.R., COLBY S.D., MILLER L.K., et al. "Treatment of penicillin-resistant Neisseria gonorrhoeae with oral norfloxacin". N. Engl. J. Med. 311, 137-140 (1984).
- 60.- FONG I.W., LINTON W., SIMBUL M., et al. "Treatment of nongonococcal urethritis with ciprofloxacin". Am. J. Med. 82 (Suppl. 4A), 311-316 (1987).
- 61.- RIGDWAY G.L., MONTAZ G., GABRIEL F.G., et al. "The activity of ciprofloxacin and other 4-quinolones against Chlamydia trachomatis and Mycoplasmas in vitro". Eur. J. Clin. Microbiol. 3, 344-346 (1984).
- 62.- HESSEN M.T., INGERMAN M.J., KAUFMAN D.H., et al. "Clinical efficacy of ciprofloxacin therapy for gram negative bacillary osteomyelitis". Am. J. Med. 82 (Suppl. 4A), 262-265 (1987).
- 63.- MONK J.P., CAMPOLI-RICHARDS D.M. "Ofloxacin: A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties, and clinical use". Drugs 33, 346-391 (1987).
- 64.- WINJANDS W.J.A. "The use of enoxacin in respiratory tract infections. In Percival A (ed): Quinolones: Their Future in Clinical Practice". London, Royal Society, 1986, pp. 51-55.
- 65.- SCULLY B.E., NEU H.C. "Oral ciprofloxacin therapy of infection caused by multi-resistant bacteria other than Pseudomonas aeruginosa". J. Antimicrob. Chemother. 18 (Suppl. D), 179-186 (1986).
- 66.- SCULLY B.E., NEU H.C. "Ofloxacin therapy of infection due to Pseudomonas aeruginosa and other multi-resistant bacteria". Abstract 1228, 26th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. New Orleans, October 1986.
- 67.- SCULLY B.E., NEU H.C., PARRY M.F., et al. "Oral ciprofloxacin therapy of infections due to Pseudomonas aeruginosa". Lancet 1, 819-822 (1986).
- 68.- SCULLY B.E., NAKATOMI M., ORES C., et al. "Ciprofloxacin therapy in cystic fibrosis". Am. J. Med. 82 (Suppl. 4A), 196-201 (1987).
- 69.- DuPont H.L., CORRADO M.L., SABBAJ J. "The use of norfloxacin in the treatment of acute diarrheal disease". Am. J. Med. 82(6B), 70-74 (1987).
- 70.- DIRIDL G., PICHLER H., WOLF D. "Four weeks' treatment of

adult chronic Salmonella carriers with ciprofloxacin and its influence on the fecal flora". In Neu HC, Weuta H (eds.): Proceedings First International Ciprofloxacin Workshop. Amsterdam, Excerpta Medica, 370-372 (1986).

- 71.- FASS R.J. "Treatment of skin and soft tissue infections with oral ciprofloxacin". J. Antimicrob. Chemother. 18 (Suppl. D), 153-158 (1986).
- 72.- ERON L.J. "Therapy of skin and skin structure infections with ciprofloxacin: An overview". Am. J. Med. 82 (4A), 224-226 (1987).
- 73.- DAVIES S., SPARHAM P.D., SPENCER R.C. "Comparative in vitro activity of five fluoroquinolones against mycobacteria." J. Antimicrob. Chemother. 19, 605-609 (1987).
- 74.- DEKKER A.W., ROZENBERG-ARSKA M., VERHOEF J. "Infection prophylaxis in acute leukemia: A comparison of ciprofloxacin with trimethoprim-sulfamethoxazole and colistin". Ann. Intern. Med. 106, 7-12 (1987).
- 75.- ARCIERI G., GRIFFITH E., GRUENWALDT G., et al. "Ciprofloxacin: An update on clinical experience". Am. J. Med. 82 (Suppl. 4A), 381-386 (1987).
- 76.- RUBENSTEIN E., SEGEV S. "Drug interactions of ciprofloxacin with other nonantibiotics agents." Am. J. Med. 82 (Suppl. 4A), 119-123 (1987).
- 77.- F. PONZ, A. ILUNDAIN and M.LLUCH. "Method for Successive Absorptions with Intestinal Perfusion in vivo". R. esp. Fisiol., 35, 97-104 (1979).
- 78.- KATSUMI-MIYAZAKI, KYOKO SUNADA, KEN ISEKI and TAKAICHI ARITA. "Simultaneous Vascular and Luminal Perfusion of Rat Small Intestine". Chem. Pharm. Bull. 34(9) 3830-3835 (1986).
- 79.- KOJIMA S., SMITH R.B., CROUTHAMEL W.G., DOLUISIO J.T. "Drug absorption VI: Water flux and drug absorption in an "in situ" rat gut preparation". J. Pharm. Sci., 1061-1064 (1972).
- 80.- VON DERSCHER J., BURI P., DESHUSSES J., SUCKER H. "Absorption rate of drugs in rats. Improvement of the in situ modified Doluisio method". Acta Pharm. Technol. 35, 75-78 (1989).
- 81.- C. GABUS-SANNIÉ et P. BURI. "Etude comparative des méthodes de détermination du volume d'eau absorbé lors de perfusion de l'intestin grêle du rat". S.T.P. Pharma 3(11) 856-860 (1987).

- 82.- DOLUISIO J.T., BILLUPS N.F., DITTERT L.W., SUGITA E.T., SWINTOSKY J.V. "Drug absorption (I). An "in situ" rat gut technique yielding realistic absorption rates" . J. Pharm. Sci. 58, 1196-1199 (1969).
- 83.- DOLUISIO J.T., CROUTHAMEL W.G., TAN G.H., SWINTOSKY J.V., DITTERT L.W. "Drug absorption (II). Effect of membrane storage on the kinetics of drug absorption. J. Pharm. Sci. 59, 72-76 (1979).
- 84.- BORGSTROM B., DAHLQUIST A., LUNDH G., SJOVALL J. "Studies of intestinal digestion and absorption in the human". J. Clin. Invest. 36, 1521-1536 (1957).
- 85.- SCHELD H.P. et CLIFTON J.A. "Small intestinal absorption of steroids". Gastroenterology, 41, 491-499 (1961).
- 86.- MILLER D.L. et SCHEDL H.P. "Total recovery studies of nonabsorbable indicators in the rat small intestine". Gastroenterology, 58, 40-46 (1970).
- 87.- AMIDON G.L., LEESMAN G.D. et ELLIOTT R.L. "Improving intestinal absorption of water-insoluble compounds: a membrane metabolism strategy". J. Pharm. Sci., 69, 1363-1368 (1980).
- 88.- TEEM M.V. et PHILLIPS S.F. "Perfusion of the hamster jejunum with conjugated and unconjugated bile acids: inhibition of water absorption and effects on morphology" Gastroenterology, 62, 261-267 (1972).
- 89.- GARCIA ARUMI E. "Estudio de los posibles factores que influyen en la determinación de la constante de absorción de medicamentos por métodos directos". Tesina de Licenciatura. Barcelona (1983).
- 90.- COLLADO E.F., FABRA CAMPOS S., PERIS RIBERA J.E., CASABO V.G., MARTIN VILLODRE A., PLA DELFINA J.M. "Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption. II. Aromatic amines in rat small intestine". Int. J. Pharm. 44, 187-196 (1988).
- 91.- HARPER J.F. "Peritz's F test: BASIC program of a robust multiple comparison test for statistical analysis of all differences among group means". Comput. Biol. Med. 14, 137-145 (1984).
- 92.- FREIXAS BAZACO J., COCA MARTORELL C., POBLET RIUS J.M^a. "Influencia de las propiedades fisicoquímicas de las 6-fluoroquinolonas en la elucidación de su actividad antimicrobiana". Rev. Esp. Quimioterap. 2, 232-236 (1989).