

# Estudio preliminar para la cuantificación de Nitrofurantoína en suero humano por cromatografía líquida de alta resolución

## Preliminary study for the quantification of Nitrofurantoin in Human Serum by High-Resolution Liquid Chromatography

MARISOL GÓMEZ<sup>1\*</sup>, MELINA MONASTERIOS<sup>2</sup>, OSMARY MEDINA<sup>3</sup>

### Resumen

La Nitrofurantoina (NTF), es un derivado del 5-nitrofurano, el cual es un agente antibacteriano sintético que ha sido empleado en la terapia de las infecciones urinarias desde 1953. En el actual estudio se logró desarrollar un método analítico exacto, preciso, reproducible, selectivo, confiable y sensible por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa para la determinación de NTF, en muestras de suero humano. Los resultados obtenidos nos indican que la cuantificación de la NTF muestra linealidad en un rango de concentraciones de 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL y 2,5 µg/mL, con un límite de detección de 0,06 µg/mL y un límite de cuantificación de 0,08 µg/mL. La desviación estándar relativa promedio de los ensayos intradiarios para la NTF fue 1,91% y la desviación estándar relativa promedio para los ensayos interdiarios para la NTF fue 2,10%.

**Palabras clave:** Nitrofurantoina, Suero humano, HPLC

### Abstract

The Nitrofurantoin (NTF) is a derivative of 5-nitrofurane, which is a synthetic antibacterial agent that has been used in the therapy of urinary tract infections since 1953. In the current study was able to develop an analytical method, exact, precise, reproducible, selective, reliable and sensitive liquid chromatography (HPLC) reverse phase for the determination of NTF, in human serum samples. The results indicate that quantification of the NTF shows linearity in the range of concentrations of 0.5 µg / mL, 1.0 µg / mL, 1.5 µg / mL, 2.0 µg / mL and 2.5 µg / mL with a detection limit of 0.06 mg / mL and a quantification limit of 0.08 mg / mL. The average relative standard deviation of intra-day trials for NTF was 1.91% and average relative standard deviation for the tests for the NTF Inter-day was 2.10%.

**Key words:** Nitrofurantoin, Human serum, HPLC.

### Introducción

Los derivados del 5-nitrofurano son compuestos que han sido ampliamente usados en medicina humana y veterinaria por más de 60 años y en los últimos años se ha incrementado la investigación sobre ellos debido a que presentan además de las conocidas actividades antibacteriana y antichagásica, otras como antifúngica, antituberculosa y amebicida. Además los organismos susceptibles a estos compuestos crean muy poca resistencia, son relativamente poco tóxicos, se pueden formar derivados partiendo de

esquemas sintéticos sencillos de bajo costo y con la elucidación estructural del complejo de la enzima Tripanotión reductasa y su sustrato natural tripanotión, se puede lograr un diseño racional de estos derivados como agentes antichagásicos específicos (Monasterios y Avendaño, 2007).

La actividad antibacteriana de los derivados del furano depende de la presencia del grupo nitro en la posición 5 y muchas variaciones de la cadena lateral presente en la posición 2. La utilidad de los derivados del furano en quimioterapia antibacteriana fue

<sup>1\*</sup> Cátedra de Análisis Farmacéutico. mgomezfernandez@hotmail.com.

<sup>2</sup> Unidad de Química Medicinal.

<sup>3</sup> Laboratorio de Control de Calidad. Facultad de Farmacia Universidad Central de Venezuela.

reconocida por primera vez por Dodd y Stilman en 1944, quienes descubrieron que la adición de un grupo nitro en la posición 5 de este anillo le confería, a estos compuestos, propiedades antibacterianas definidas (Dodd y Stillman, 1944). Las variaciones en la posición 2 del anillo han originado un gran número de compuestos antimicrobianos, entre ellos: Nitrofurantoina, Nitrofurazona y Furozolidina, fármacos éstos de gran espectro, efectivos en la medicina humana y en veterinaria desde hace más de 50 años.

La relación entre la estructura de los derivados del nitrofurano y su actividad antibacteriana ha sido discutida desde varios puntos de vista y se han obtenido las siguientes conclusiones: El grupo nitro es indispensable, la ausencia del grupo nitro origina muy poca o ninguna actividad. La introducción de un doble enlace conjugado  $-CH=CH-$  ó  $-CH=N-$ , entre el grupo nitrofuril y la parte final del sustituyente en posición 2, es un grupo complementario e incrementa la actividad (Åkerblom, 1974).

El mecanismo de acción de los nitrofuranos radica en la toxicidad de los radicales libres generados durante su reducción. Estos agentes ejercen múltiples efectos sobre la célula bacteriana, incluyendo la inhibición del metabolismo de los carbohidratos y daño en el ADN, lo cual parece ser la causa principal de su toxicidad bacteriana. Los daños al ADN y la muerte celular de las bacterias y los protozoarios son ocasionados por especies intermediarias altamente reactivas tales como los radicales libres que se producen durante el proceso de reducción, debido a que el radical anión nitroaril reducido puede ser oxidado por el oxígeno molecular para producir aniones superóxido (Gringauz, 1997). Los derivados del 5-nitrofurano, que son reducidos fácilmente, muestran actividad contra las bacterias aeróbicas y anaeróbicas, esto parece ser debido a la presencia de dos tipos de enzimas nitroreductasas, que ya han sido descritas para *Escherichia coli*, una sensible al oxígeno que es capaz de reducir a los nitrofuranos sólo en ausencia de oxígeno y otra insensible al oxígeno, que reduce a los nitrofuranos bajo condiciones aeróbicas (Bryant y col., 1981).

Los nitrofuranos poseen acción bacteriostática y bactericida *in vitro* según la concentración utilizada y actúan sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Townson y col., 1994), siendo mucho más activos contra bacterias anaeróbicas, las cuales contienen un sistema enzimático altamente eficiente que, reduce el grupo nitro; son menos activos contra las bacterias aeróbicas y las bacterias anaeróbicas facultativas y pierden totalmente su actividad frente a las bacterias que no tiene el mecanismo enzimático para la nitroreducción (Hof, 1989).

La nitrofurantoina (NTF) (1-(((5-nitro-2-furanil)metileno) amino) imidazolidina-2,4-diona) (Figura 1), es un agente antibacteriano sintético derivado del nitrofurano que se ha empleado en la terapia de las infecciones urinarias desde 1953 (Muth y col., 1996). Este fármaco es usualmente bacteriostático, se emplea en el tratamiento y prevención de las infecciones del tracto urinario causadas por microorganismos gram-negativos y algunos gram-positivos; *Pseudomonas*, *Serratia* y algunas especies de *Proteus* (Drug Information, 2005) y es muy eficaz para la profilaxis de infecciones recurrentes de las vías urinarias (Brumfit y col., 1995). Es activo contra *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Neisseria*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Hammam, 2002); otro uso importante que se le ha dado a este tipo de compuestos es en el tratamiento experimental de neumonía causada por *Pneumocystis carinii* (PCP) principal agente causante de neumonía en pacientes inmunodeprimidos, debido a que varias clases de fármacos como las diamidinas y los nucleósidos de purina, que presentan también actividad tripanocida, han mostrado actividad contra este microorganismo (Toropchin y col., 2003; Walzer y col., 1991). La NTF se absorbe en forma rápida y completa en las vías gastrointestinales, la forma macrocristalina se absorbe y excreta más lentamente, debido a su pobre disolución (causa menos dolor gastrointestinal) (Drug information, 2005). Su unión a las proteínas plasmáticas es aproximadamente un 40%; la vida media plasmática es de 20-60 minutos, que se prolonga en los pacientes con insuficiencia renal. Atraviesa la placenta y se distribuye en la leche y la bilis.

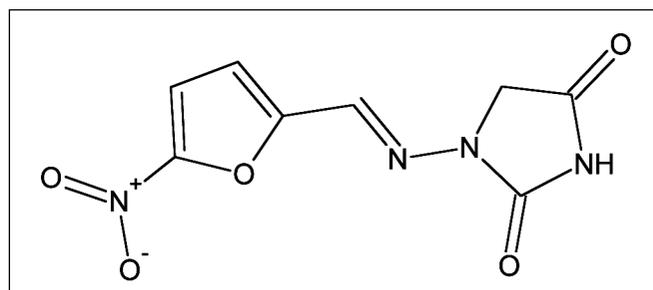


Figura 1. Estructura química de la Nitrofurantoina.

La NTF es parcialmente metabolizada en el hígado; después de 24 horas de 30-50% del fármaco se excreta por vía urinaria sin modificaciones a través de una filtración glomerular y secreción tubular y cerca del 1% se excreta en la orina como aminofurantoina e imparte un color pardo a la orina (Hammam, 2002). La dosis oral de la NTF en adultos es de 50 a 100 mg cada seis horas y con los alimentos se incre-

menta su biodisponibilidad. En pacientes adultos con una función renal normal, después de una dosis oral de NTF como microcristales, se obtienen concentraciones plasmáticas menores a 2 µg/mL. La dosis en los niños es de 5-7 mg/kg/día divididos en dosis cada 6 horas, hasta un máximo de 400 mg/día (Drug Information, 2005; Repetto y Repetto, 2005).

Existen numerosas situaciones donde se requiere el análisis cuantitativo de la NTF tanto en la elaboración de la forma farmacéutica como para su detección en fluidos biológicos. La determinación del fármaco en las formulaciones farmacéuticas es obligatoria y debe regirse por especificaciones de bibliografías oficiales; muchos estudios farmacológicos requieren de determinaciones cuantitativas para establecer las cantidades en la dosificación, la toxicidad y las respuestas alérgicas, así como la deducción de la resistencia de las cepas bacterianas.

Se han descrito diferentes métodos de análisis, para la cuantificación de la NTF en fluidos biológicos; entre los que se encuentran los métodos microbiológicos los cuales no son específicos para un antibacteriano en particular; ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), métodos amperométricos por reducción del flujo de inyección (Ghawji y col., 1986; Fogg y col., 1988), métodos espectrofotométricos (Hassan y col., 1988), métodos de detección electroquímica (Galeano y col., 1997), cromatografía líquida de alta resolución (Ebel y col., 1979; Ebel y col., 1980; Hoener, y col., 1980; Ruth y col., 1996; Gerk y col., 2001; Arancibia y col., 2002), voltamperometría de redisolución catódica (Hammam E, 2002), polarografía (Faith y col., 1983; Surmann y col., 1985) y polarografía de pulso diferencial (Sridevic y col., 1991), entre otros. Los métodos amperométricos, polarográficos, de flujo de inyección y espectrofotometría no ofrecen un límite de cuantificación suficiente para el ensayo del fármaco en los fluidos biológicos, además, los métodos cromatográficos empleados en el análisis del fármaco requieren para la determinación del mismo un tratamiento previo de la muestra y un tiempo considerablemente extenso para los procesos de extracción con una exposición prolongada a la luz.

Las concentraciones terapéuticas de NTF no se detectan en pacientes con depuraciones de creatinina menores de 40 mL/min. (Hammam, 2002). En función de esto nos propusimos desarrollar un método analítico específico para la NTF, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección ultravioleta que permita, su detección y cuantificación en suero humano de una manera exacta, precisa, reproducible, sensible y selectiva.

## Materiales y métodos

### REACTIVOS

Fosfato monobásico de sodio, grado reactivo marca Mallinckrodt AR®. Ácido *o*-fosfórico, Ácido Perclórico, todos grado reactivo marca Riedel-De Haën AG, Seelze-Hannover. Buffer Acetato de Sodio pH 4,00. Metanol grado HPLC marca Merck KGaA, Darmstadt, Alemania. NTF macrocristalina lote 06505 99,90% de pureza, suministrado por Grupo Farma. Hidroclorotiazida (HCT) 99,57% p/p suministrado por Laboratorios Leti. Las muestras de suero provienen de sujetos sanos libres del Virus de Inmunodeficiencia Humana, libres de nitrofurantoina y del estándar interno, fueron donadas por el Laboratorio de la Unidad de Detección de Medicamentos y Química Clínica del Instituto de Medicina Experimental (UNIDEME) de la Universidad Central de Venezuela.

### EQUIPOS

Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución (HPLC) marca Waters, equipado con: un Inyector manual modelo U6K, una Bomba de distribución de solventes modelo 510, un Detector ultravioleta modelo 484, un Módulo de datos modelo 745B, una Columna marca Phenomenex serie Luna® C<sub>18</sub> de 150 cms de longitud y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil se filtró utilizando un Equipo de Filtración Millipore® con un filtro sostenedor Parte #4 (Filter Holder Part #4) que utiliza los filtros Millipore tipo HA 0,45 µm (Estados Unidos). Las muestras de suero fueron almacenadas en un Frizer Ultra-Low de rango de temperatura de 0 a -60 °C y centrifugadas en una Centrífuga Refrigerada de Alta Velocidad Marca Sorvall® RC-5B Du-Pont Instruments.

### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Atenuación: 4.

Ancho de pico (PW): 2

Longitud de onda de absorción: 268 nm.

Sensibilidad del detector: 0,02 AUFS.

Tiempo de corrida: 8 minutos.

Velocidad de flujo: 1,2 mL/minuto.

Velocidad del papel: 0,5 cm/minuto.

Volumen de inyección: 20 mL.

### PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

Se preparó mezclando una solución de fosfato dibásico de sodio 5mM a pH 3,0 con ácido *o*-fosfórico y acetonitrilo grado HPLC en una proporción de (75:25). Esta solución fue filtrada a través de un equipo de

Filtración Millipore® Filter Holder Part #4 equipado con filtros Millipore tipo HA 0,45 µm, desgasificada por aplicación de vacío y agitación magnética durante 5 minutos seguida por ultrasonido por 10 minutos.

#### SOLUCIONES ESTÁNDAR

Se prepararon soluciones frescas de trabajo para patrones a las concentraciones finales de 0,5, 1,0, 1,5 2,0 y 2,5 µg/mL, a partir de una solución madre de NTF de concentración final 50 µg/mL. Las soluciones deben ser protegidas de la luz.

Se preparó diariamente la solución de trabajo del estándar interno a una concentración final de 1,0 en µg/mL, a partir de una solución madre de concentración 50 µg/mL.

Las muestras de la mezcla combinada de suero humano de varios voluntarios sanos, fueron recolectadas en tubos de vidrio con tapa y congeladas a una temperatura de -20 °C hasta el momento de ser analizadas.

#### PRECIPITACIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL SUERO HUMANO

La precipitación de las proteínas presentes en el suero humano se realizó mediante el empleo de una solución de ácido perclórico al 30% v/v (Gómez, 2007).

#### PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE SUERO HUMANO

Se empleó como estándar interno a la Hidroclorotiazida (HCT).

En tubos de centrifuga Eppendorf® de polipropileno de 1,5 mL de capacidad, previamente rotulados fueron adicionados 50 µL de la mezcla combinada de suero humano. En ambos tubos se añadieron cantidades adecuadas de la solución patrón de NTF de 50 µg/mL (de acuerdo a la concentración de NTF a preparar para el posterior análisis) y 100 µL de la solución de HCT de 50 µg/mL. A los tubos se les agregó 100 µL de la solución precipitante de ácido perclórico al 30% v/v, y agua desionizada en cantidad suficiente para 1 mL; se agitaron en un vortex durante 15 segundos y centrifugaron durante 10 minutos a 12.000 revoluciones por minuto a una temperatura de 10 °C.

Se transfirió una alícuota de 200 µL del sobrenadante y 800 µL de la fase móvil a un vial de vidrio de 3 mL de capacidad con tapa; posteriormente la mezcla fue sometida a agitación en el vortex durante 15 segundos. Una alícuota de 20 µL de esta última solución fue inyectada en el cromatógrafo líquido.

CURVA DE CALIBRACIÓN DE NITROFURANTOÍNA EN SUERO. RANGO DE CONCENTRACIONES DE 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL Y 2,5 µg/mL

En 6 tubos de centrifuga Eppendorf® de polipropileno de 1,5 mL de capacidad, previamente rotulados fueron agregados 50 µL de la mezcla combinada de suero humano. En los tubos 1, 2, 3, 4 y 5 se añadieron 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL y 250 µL, respectivamente de la solución patrón de NTF de concentración 50 µg/mL y 100 µL de la solución de HCT de concentración 50 µg/mL a cada uno de los tubos. En el tubo 6, rotulado como blanco, se omitió la adición de las soluciones de NTF y HCT. Estos seis (6) tubos se agitaron en el vortex por 15 segundos y posteriormente se procedió según el método de preparación de la muestra de suero e inyección en el cromatógrafo líquido, previamente descrito.

#### LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección se determinó de manera matemática empleando para ello la fórmula la siguiente (Quattrocchi y col., 1992):

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 3 S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Dónde,

- $Y_{bl}$  = Respuesta del blanco
- $S_{bl}$  = Desviación estándar del blanco
- $b$  = Pendiente de la curva de calibración
- $n'$  = Número de determinaciones

#### LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación fue determinado de manera matemática empleando para ello la fórmula: (Quattrocchi y col., 1992):

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bl} + 10 S_{bl}}{b} \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

Dónde,

- $Y_{bl}$  = Respuesta del blanco
- $S_{bl}$  = Desviación estándar del blanco
- $b$  = Pendiente de la curva de calibración
- $n'$  = Número de determinaciones

### PRECISIÓN Y EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO

La precisión intradiaria del método, en condiciones de repetibilidad, fue expresada como la desviación estándar relativa de cuatro curvas de calibración de NTF idénticas (rango de concentración: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL y 2,5 µg/mL) las cuales se prepararon e inyectaron por triplicado en el cromatógrafo líquido en un mismo día.

La precisión interdiaria del método, en condiciones de reproducibilidad, se expresó como la desviación estándar relativa de tres curvas de calibración de NTF idénticas (rango de concentración: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL y 2,5 µg/mL) las cuales se prepararon e inyectaron en el cromatógrafo líquido por triplicado durante tres días diferentes.

La exactitud del método fue expresada como el porcentaje de recuperación obtenido en las muestras durante los ensayos de precisión intradiaria e interdiaria.

### Resultados y discusión

La interferencia originada por los compuestos endógenos del suero se minimizó mediante el uso de la técnica de precipitación de proteínas previamente descrita, la cual es una metodología sencilla que se basa en la extracción del compuesto de interés rápida y eficiente.

La separación del analito y patrón interno, (NTF y HCT) de los compuestos endógenos del suero fue bien definida empleando el sistema seleccionado para tal fin en fase reversa con una fase móvil constituida por monofosfato de sodio 5 mM a pH 3,00: acetonitrilo (75:25) lo cual se tradujo en un tiempo de análisis de 5 minutos, que es inferior a los reportado previamente en la literatura (Muth y col., 1996). Esto le confiere una ventaja a este método.

El cromatograma obtenido de la inyección del blanco de la mezcla combinada de suero humano preparado como fue descrito, muestra que el pico correspondiente a los compuestos endógenos del suero no interfiere con el pico del analito de interés ni del estándar interno (Figura 2).

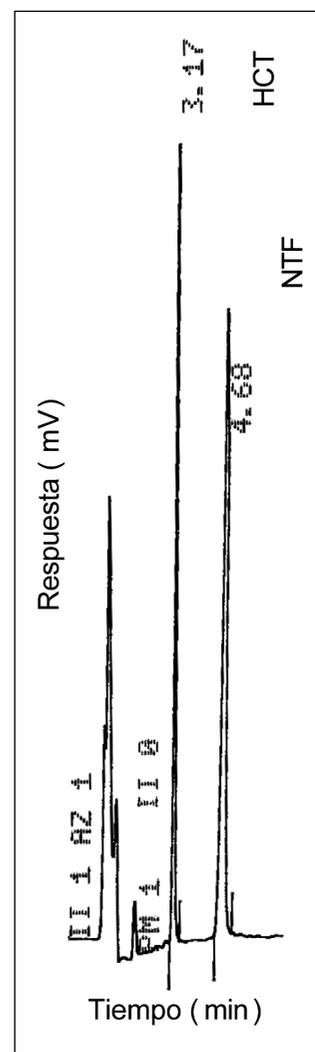
Del mismo modo, se puede observar en el cromatograma obtenido de la inyección de la solución patrón de NTF (concentración 1,0 µg/mL) y el patrón interno HCT (concentración 1,0 µg/mL) en la mezcla combinada de suero humano, que existe una buena resolución entre los picos de interés, resultando en los tiempos de retención de 4,68 minutos y 3,17 minutos, respectivamente (Figura 3).

### LINEALIDAD Y SENSIBILIDAD

La linealidad del método en la mezcla combinada de suero humano, se realizó mediante la construcción



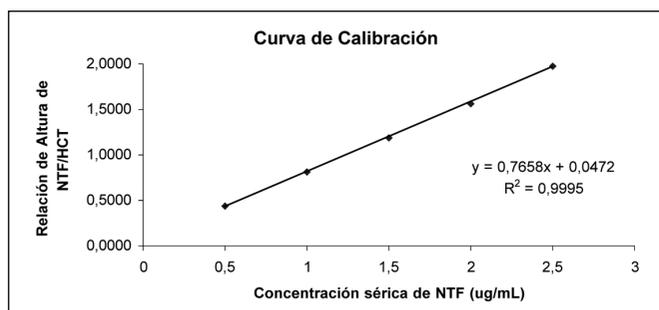
**Figura 2.** Cromatograma correspondiente a la inyección del blanco de la mezcla combinada de suero humano.



**Figura 3.** Cromatograma correspondiente a la inyección de una solución patrón de NTF (concentración 1,0 µg/mL) y HCT (patrón interno, concentración 1,0 µg/mL) en la mezcla combinada de suero humano.

de la curva de calibración en la que se representa en el eje de las ordenadas la relación de la altura de los picos NTF/HCT versus la concentración sérica de NTF en el eje de las abscisas.

La curva corregida por el método de regresión de los mínimos cuadrados resultó en la ecuación  $y = 0,7658x + 0,0472$  con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0,9995$  y un coeficiente de correlación de  $0,99977$  (Figura 4), demostrando sensibilidad, con pequeños cambios en la concentración del analito de interés se obtienen grandes cambios en la respuesta analítica.



**Figura 4. Curva de calibración de Nitrofurantoína en la mezcla combinada del suero humano. Rango de concentraciones: 0,5 µg/mL; 1,0 µg/mL; 1,5 µg/mL; 2,0 µg/mL; y 2,5 µg/mL.**

#### PRECISIÓN Y EXACTITUD

La Tabla I detalla los resultados obtenidos para la determinación de la precisión intradiaria del método analítico, en condiciones de repetibilidad. Como se observa el porcentaje de la desviación estándar relativa promedio para la Nitrofurantoína fue 1,91%. De igual modo, los resultados correspondientes a la precisión interdiaria del método analítico, en condiciones de reproducibilidad se presentan en la Tabla II. Como se detalla el porcentaje de la desviación es-

Tabla I

#### Precisión y exactitud intradiaria de Nitrofurantoína en las muestras de suero humano a 5 niveles de concentración

Concentración de NTF µg/ml	% Promedio de recuperación	% DER <sup>a</sup>	Número de muestras
0,5	95,45	2,60	4
1,0	95,53	2,09	4
1,5	95,60	2,77	4
2,0	96,05	0,74	4
2,5	97,59	1,37	4
% de Desviación estándar relativa promedio:		1,91%	

Se realizaron cuatro curvas de calibración independientes, preparadas en el mismo rango de concentración e inyectadas por triplicado durante el mismo día.

a= Desviación estándar relativa

Tabla II

#### Precisión y exactitud interdiaria de Nitrofurantoína en las muestras de suero humano a 5 niveles de concentración

Concentración de NTF µg/ml	% Promedio de recuperación	% DER <sup>a</sup>	Número de muestras
0,5	95,24	2,47	9
1,0	97,54	1,80	9
1,5	95,57	2,54	9
2,0	98,31	1,85	9
2,5	98,43	1,85	9
% de Desviación estándar relativa promedio:		2,10 %	

Se realizaron tres curvas de calibración independientes, preparadas diariamente en el mismo rango de concentración e inyectadas por triplicado durante tres días diferentes.

a= Desviación estándar relativa

tándar relativa promedio para la Nitrofurantoína fue 2,10%. En lo que respecta a la exactitud del método analítico reportada como el porcentaje de recuperación obtenido en el ensayo de precisión intradiaria ésta osciló entre 95,45% y 97,59%; mientras que, el porcentaje de recuperación obtenido en el ensayo de precisión interdiaria osciló entre 95,24% y 98,43%.

#### Límite de detección y cuantificación

El límite de detección calculado mediante el empleo de la fórmula matemática, fue de 0,06 µg/mL de NTF.

El límite de cuantificación determinado utilizando la fórmula matemática, fue 0,08 µg/mL de NTF.

#### Conclusiones

Nuestros resultados nos permiten concluir que la determinación de Nitrofurantoína en el suero humano mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detección ultravioleta, constituye una herramienta óptima, ya que requiere de bajas cantidades de muestra, con tiempos de respuesta cortos para el análisis del fármaco, con un rango de cuantificación lineal desde 0,5 µg/mL a 2,5 µg/mL, un límite de detección de 0,06 µg/mL y un límite de cuantificación de 0,08 µg/mL de NTF. Todo ello permite detectar las concentraciones plasmáticas inferiores a 2 µg/mL de NTF, las cuales se alcanzan después de la administración de una dosis oral de 100 mg de NTF. El método analítico es reproducible, exacto, preciso, selectivo, sensible y confiable, con porcentajes de recuperación obtenidos con los ensayos intradiarios e interdiarios que oscilan desde 95,24% a 98,43% y una Desviación Estándar Relativa promedio inferior al 2%.

## Agradecimientos

A la Unidad de Detección de Medicamentos y Química Clínica del Instituto de Medicina Experimental (UNIDEME) de la Universidad Central de Venezuela por la colaboración brindada. Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. PG-06-00-5645-2004.

## Referencias bibliográficas

- Åkerblom EB. 1974. Synthesis and Structure-Activity Relationships of a Serie of Antibacterially Active 5-(5-Nitro-2-furfurylidene)thiazolones, 5-(5-Nitro-2-furylpropenylidene) thiazolones y 6-(5-Nitro-2-furyl)-4H-1,3-thiazinones. *J. Med. Chem.* 17: 609-615.
- Arancibia V, Valderrama M, Madariaga A, Zúñiga MC, Segura R. 2003. Extraction of Nitrofurantoin and its Toxic Metabolic from Urine by Supercritical Fluids. Quantitation by High Performance Liquid Chromatography with UV Detection. *Talanta.* 61: 377-383.
- Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 1994. *Biology of Microorganisms*, 7ª Edition. Prentice Hall. Estados Unidos de Norte América.
- Bryant DW, McCalla DR, Leeksa M, Laneville P. 1981. Type I Nitroreductases of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol* 27 (1): 81-86.
- Dodd MC, Stillman WB. 1944. The in Vitro Bacteriostatic Action of Some Simple Furan Derivatives. *J Pharmacol Exp Ther* 82: 11-18.
- Drug Information Handbook. 2005. 13<sup>th</sup> Edition. Editorial Advisory Panel.
- Ebel S, Liedtke B, Missler M, Richer M, Surmann P. 1979. Quantitative Determination of Nitrofurantoin in Urine *Arch Pharm (Weinheim)*. 312(8):689-96.
- Ebel S, Liedtke R, Missler B. 1980. Quantitative Determination of Nitrofurantoin in Body Fluids by HPLC with Direct Injection *Arch der Pharmazie (Weinheim)*. 313(1): 95-96.
- Faith L, Strakova A. 1983. Contribution to the Polarographic Determination of Nitrofurantoin. *Cesk Farm.* 32(1): 19-22.
- Fogg AG, Ghawji AB. 1988. Reductive Amperometric Determination of Nitrofurantoin and Acetazolamide at a Sessile Mercury Drop Electrode Using Flow Injection Analysis. *Analyst.* 113(5):727-30.
- Galeano DT, Guiberteau CA, Acedo V MI, Correa CA, Salinas F. 1997. Determination of Nitrofurantoin, Furazolidone and Furaltadone in Milk by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *J Chromatogr* 764 (2): 243-248.
- Gerk PM, OO Ch, Paxton EA, Moscow JA, Mcnamara PJ. 2001. Interactions Between Cimetidine, Nitrofurantoin and Probenecid Active Transport into Rat Milk. *J Pharmacol Exp Ther.* 296 (1): 175-180.
- Ghawji AB, Fogg AG. 1986. Reduction in Size by Electrochemical Pretreatment at High Negative Potentials of the Background Currents Obtained at Negative Potentials at Glassy Carbon Electrodes and its Application in the Reductive Flow Injection Amperometric Determination of Nitrofurantoin. *Analyst.* 111: 157-162.
- Gómez M, González M. 2007. Método Analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución en Fase Reversa para la Determinación de Cefadroxilo en el Suero Humano. *Revista de la Facultad de Farmacia.* 70(2): 21-27.
- Gringauz A. 1997. *Introduction to Medicinal Chemistry; How Drugs Act and Why.* Wiley – VCH, Inc.
- Hammam E. 2002. Determination of Nitrofurantoin Drug in Pharmaceutical Formulation and Biological Fluids by Square-Ware Cathodic Adsorptive Stripping Voltammetry. *J Pharmac Biom Anal.* 30:651-659.
- Hassan SM, Sharaf-El-Din M, Belal F, Sultán M. 1988. Application of Difference Spectroscopy to the Determination of Some Pharmaceutically Important Nitro Compounds. *J Pharm Pharmacol.* 40(11):798-800.
- Hoener BA, Wolff JL. 1980. High-Performance Liquid Chromatographic Assay for the Metabolites of Nitrofurantoin in Plasma and Urine. *Journal of chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 182 (2): 246-251.
- Hof H. 1989. Antibacterial Activities of the Antiparasitic Drugs Nifurtimox and Benznidazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33 (3): 404-405.
- Litter M. 1988. *Farmacología Experimental y Clínica.* 7ª Edition. El Ateneo. Argentina.
- Monasterios M, Avendaño M. 2007. Derivados del 5-nitrofurano: desde Dodd y Stillman hasta Nuestros Días. *Revista de la Facultad de Farmacia.* 70: 38-46.
- Muth P, Metz R, Siems B, Bolten W W, Vergin H. 1996. Sensitive Determination of Nitrofurantoin in Human Plasma and Urine by High-Performance Liquid Chromatography. *J Chromatogr.* 729: 251-258.
- Petri WA. 1996. Antimicrobianos. Sulfonamidas, trimetopim-sulfametoxazol, quinolonas y fármacos contra las infecciones de las vías urinarias. En: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (J. G., Hardman, L. E. Limbird., Molinoff, P. B., Ruddon, A. Goodman Gilman, Eds.). (Novena Edición).* Editorial McGraw-Hill Interamericana. Editores, S.A. de C.V. de México. Capítulo: 44, p. 1202-1203.
- Quattrocchi O, Abelaira S, Laba R. 1992. *Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica.* Artes Gráficas Farro S.A, California 2750/52 (1989) Buenos Aires. Capítulo: 12, p. 301-325.
- Repetto MR, Repetto M. 2005. Tabla de Concentraciones de Xenobióticos en Fluidos Biológicos Humanos como Referencia para el Diagnóstico Toxicológico (actualización 2005). En: «Ampliación de Toxicología de Postgrado», M Repetto, Ed Área de Toxicología. Universidad de Sevilla. CD-Rom. Sevilla.

- Smith R, Stewart J. 1981. Textbook of Biopharmaceutic Analysis. Copyright© Lea & Febiger. Chapter 5: Treatment of Chromatography Data, 95-114.
- Surman P, Aswakun P. 1985. Simultaneous Polarographic Determination of Nitrofurantoin and Phenazopyridine in Tablets. Arch Pharm. 318(1):14-21.
- Toropchin VI, Kabelsskii VV, Babitskii VL, Savchenko NA, Tereshchenl VV. 2003. Treatment of Patients with Acute Pneumonia. Lik Sprava. 3-4: 72-74.
- Towson SM, Boreham PFL, Upcroft P, Upcroft JA. 1994. Resistance to the Nitroheterocyclic Drugs. Acta Trop. 56: 173-194.
- Walzer P, Kurtis C, Foy J, Zhang J. 1991. Furazolidone and Nitrofurantoin in the Treatment of Experimental *Pneumocystis carinii*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 158-163.
- Zhanel GG, Hoban DJ, Karlowsky JA. 2001. Nitrofurantoin is Active Against Vancomycin-Resistant *Enterococci*. Antimicrob. Agents Ch. 45: 324-326.