

DETERMINACION DE LA EXCRECION DE DROGAS ANTIMALARICAS EN LA ORINA EN PROGRAMAS DE ERRADICACION QUIMIOTERAPEUTICA EN GRAN ESCALA*

L. J. BRUCE-CHWATT, M.D., M.P.H., D.T.M. y H.

Jefe de la Sección de Estudios y Planes, División de Erradicación del Paludismo, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza

INTRODUCCION

El lugar que ocupa la quimioterapia en la fase de vigilancia de la erradicación de la malaria se conoce ya bastante bien y, por consiguiente, no es necesario examinar este punto en el presente trabajo. En cambio, el empleo de la quimioterapia en los programas de erradicación de la malaria en que el insecticida de acción residual tiene un efecto limitado, a causa de la conducta del vector principal (su resistencia adquirida), de los hábitos migratorios de la población o bien de otras características ambientales (por ejemplo, el tipo de vivienda), es relativamente nuevo, y los diversos procedimientos de administración satisfactoria de drogas en gran escala están todavía en su fase de experimentación.

Se sabe que la aceptación por parte de la población de las drogas distribuidas, difiere mucho de una zona a otra de un mismo continente y aun de un mismo país.

A este respecto se pueden citar dos grados extremos de "resistencia del consumidor": a) en varios países del hemisferio meridional, las drogas antimaláricas son tan bien acogidas que se pueden utilizar como cebo para facilitar la obtención de muestras de sangre de la población; y b) en ciertas áreas de Africa Central y Occidental, la población pastoril de los fulanis siente tanto recelo y desconfianza de los forasteros que sólo cabe esperar que acepte ocasionalmente las drogas antimaláricas. Otros ejemplos, menos extremados, son los de una pequeña zona de Nigeria en donde los más asiduos esfuerzos, inclusive la creación de un servicio de dispensario periódico, la distribución de premios, la presentación de películas, etc., no

* Publicado en inglés en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol. 20, No. 5, 1959.

consiguieron que la aceptación de las drogas distribuidas fuera superior a un 80-90%, en contraste con un área mucho mayor del Africa Occidental Francesa en donde la entrega a granel de la droga a las aldeas, acompañada de adecuadas instrucciones a los jefes, resultó notoriamente muy eficaz.

Son numerosos los sistemas de administración colectiva de drogas, y se han indicado muchos más. Estos sistemas varían considerablemente, desde el de "dar al que pide", el del halago y casi del soborno, hasta llegar a una presión considerable, más o menos paternal. Como ocurre en todos los programas de salud pública, la aplicación de estos sistemas depende mucho de la densidad de población, de las comunicaciones, de la frecuencia y del método de distribución de las drogas, de una planificación minuciosa, del nivel educativo y económico de la población interesada, del tipo de cultura del grupo y de las buenas relaciones públicas.

Bruce-Chwatt (1) ha examinado la relación entre el grado de éxito esperado y la frecuencia de la administración de drogas, y no cabe duda de que es muy necesario un nuevo producto antimalárico de actividad residual prolongada, o una nueva fórmula de "tipo repositorio" de drogas bien conocidas y experimentadas (de preferencia 4-aminoquinolinas), para administrarlas por vía oral o por inyección.

El empleo de sal medicada elimina algunas de las dificultades antes mencionadas, pero plantea algunos problemas nuevos no menos embarazosos. Esta práctica puede ser decididamente útil dondequiera que la sal se obtenga a través de un solo conducto, donde el empleo de la sal común en los alimentos es norma aceptada y la ración es más o menos regular. Aun en este caso, los problemas de

sabor, preparación, distribución y eliminación de la posible toxicidad de la sal medicada no han sido todavía resueltos, si bien actualmente se están efectuando muchos trabajos de campo.

En todos los métodos de distribución periódica de drogas en gran escala, es de considerable importancia supervisar la regularidad de ingestión por parte de la población interesada. Esto es particularmente cierto con respecto a los productos antimaláricos, y muchas de las dificultades con que nos enfrentamos actualmente no son nuevas, puesto que ya fueron estudiadas por la Comisión de Paludismo de la Sociedad de Naciones (2) en su cuarto informe general, que se refiere a la quimioterapia de la malaria y a las tentativas de erradicar la enfermedad por medio del tratamiento profiláctico.

Es interesante observar que después de 20 años tropezamos esencialmente con las mismas dificultades médicoadministrativas, si bien en menor escala. Por fortuna, las drogas con que se cuenta hoy ofrecen mayores probabilidades de éxito que las que se conocían en el período de 1933-38.

MÉTODOS DE DETERMINAR LA EXCRECIÓN DE PRODUCTOS ANTIMALARICOS EN LA ORINA

Los métodos seguidos en el pasado para comprobar la regularidad de la ingestión de productos antimaláricos tal vez no tengan más que un interés histórico; no obstante, ofrecen ciertos aspectos valiosos, dignos de tenerse en cuenta si, en cualquier programa quimioterapéutico moderno, es necesario hacer alguna comprobación de que la droga llegó a quienes se había previsto y con la regularidad deseada.

Los ejércitos británico y francés adoptaron la administración en gran escala de quinina como medida de protección, en 1915-17, durante la desastrosa campaña de Macedonia. En la "Armée d'Orient" francesa, la regularidad de la administración se controló mediante el empleo del reactivo Mayer-Tanret,* y en cualquier momento se podía pedir

* Propiamente, la mezcla de soluciones de yoduro mercúrico y yoduro potásico debería llevar

una muestra de orina de un individuo para analizarla. Si la droga se tomaba diariamente (tal como se había previsto), la prueba resultaba invariablemente positiva (6). En 1917, la incidencia de malaria entre las tropas francesas descendió en un 90% con respecto a la de 1916. En el ejército británico de Macedonia, los resultados no fueron tan satisfactorios, y es probable que los franceses tuvieran más éxito gracias a la disciplina con que emplearon la prueba Mayer-Tanret, aunque Wenyon (7) tuvo ciertas dudas acerca de ello, acerca de la seguridad de los datos registrados y la utilidad de la quinina en general.

La prueba Mayer-Tanret fue utilizada por el ejército italiano en Etiopía en 1935 y más tarde se substituyó por un ingenioso método de comprobar la ingestión regular de quinina en el campo. Las tabletas de quinina suministradas a las unidades militares, estaban combinadas con azul de metileno, y al "pasar revista de la excreción de quinina", la coloración normal de la orina de algunos individuos era una prueba concluyente de mala disciplina antimalárica. Caben pocas dudas de que la incidencia de malaria entre las tropas italianas fue muy baja (8% al año) (8).

Todavía en la primera fase de la segunda guerra mundial se utilizó la prueba de Mayer-Tanret en algunos hospitales militares para determinar la eficacia del tratamiento de quinina en el Africa Occidental (9). Posteriormente, cuando en la mayoría de las fuerzas aliadas y alemanas se substituyó la quinina por la atebriina, la atención se concentró en comprobar la excreción en la orina de la nueva droga.

Se utilizaron varios métodos para determinar la regularidad de la ingestión de ate-

el nombre de reactivo de Mayer, pues él (3) fue quien la aplicó por primera vez, y Tanret (4) fomentó su empleo en mayor escala. Este reactivo es también sinónimo de los reactivos de Artus, Valser, Bohm, Delffs, Grove, Masing, v. Planta, Thoulet, de Vrij, Winckler y recientemente Gentzkow. La adición de ácido acético al 1% fue recomendada por Giemsa y Schaumann en 1907 por suponer que mantenía mejor las propiedades de la solución ácida (5).

brina en las fuerzas británicas del Medio Oriente, del Africa Occidental y del Asia Sudoriental. En Sierra Leona, Yudkin (10) utilizó un interesante método de "colorimetría de adsorción" basado en la adsorción selectiva de atebрина de la orina por gel de sílex finamente pulverizado; en cambio, en el comando de Asia Sudoriental se aplicó un ingenioso fluorímetro de luz solar, cuyo empleo se inspiró en algunas investigaciones realizadas anteriormente por Peter (11) en Alemania.

La utilización de la paludrina en la profilaxis colectiva fue también seguida de varios programas de comprobación de la regularidad de la ingestión, especialmente después que Gage y Rose (12) presentaron un método relativamente sencillo de determinación de la droga. La utilidad de este método en el campo quedó bien demostrada en Assam, por Gilroy (13), quien encontró que en una muestra de un gran grupo de trabajadores empleados en campos de té y a los que se les suministraron tabletas de paludrina semanalmente como medida profiláctica, sólo el 56 % de estos trabajadores habían, efectivamente, tomado la droga. Como señaló Gilroy, las mejores condiciones imaginables para la eficaz profilaxis mediante drogas son, prescindiendo de las fuerzas armadas, las que ofrecen los campos de té de la India. Y, sin embargo, aunque la administración de la droga se planeó cuidadosamente, y estuvo a cargo de personal digno de confianza y debidamente registrado, los resultados distaron mucho de ser satisfactorios.

El empleo creciente de la cloroquina en programas antimaláricos en gran escala renovó el interés por la determinación de la excreción en la orina de esta droga incolora.

Aunque la determinación de la regularidad y dosificación de la administración de cloroquina puede efectuarse perfectamente por métodos cualitativos, hay circunstancias en que los métodos cuantitativos son de mayor utilidad.

Igual que la quinina, la atebрина y otras varias drogas básicas naturales o sintéticas, la cloroquina forma sales sumamente insolubles con ciertos ácidos complejos (silicotungs-

ténico, fosfomolibdico) y con yoduro mercúrico, uno de los componentes del reactivo de Mayer-Tanret. La precipitación obtenida con cloroquina en la orina puede utilizarse bien como prueba cualitativa o cuantitativa (14)*. Wilson y Edeson (18) utilizaron por primera vez una prueba cualitativa rudimentaria sobre el terreno en Malaya. El valor cuantitativo del método de Fuhrmann fue determinado por Fuhrmann y Koenig (19) en condiciones experimentales.

La prueba de Fuhrmann se funda en que la base de cloroquina es insoluble en agua en soluciones alcalinas y puede extraerse de orina alcalina por varios solventes orgánicos no miscibles. Sin embargo, la base se disuelve con facilidad en ácidos débiles y se puede reextraer fácilmente de los solventes orgánicos agitándolos con ácido. El procedimiento de doble extracción permite concentrar la droga y separarla de sustancias extrañas que pueda haber en la orina. El procedimiento fue utilizado por primera vez sobre el terreno por L. J. Charles (20) y después fue modificado y utilizado en mayor escala en Nigeria por Bruce-Chwatt y Gibson (21), quienes pusieron de relieve la confianza que merecía como prueba cuantitativa.

Se calculó la sensibilidad de este método añadiendo cantidades conocidas de sulfato de cloroquina a muestras de orina y determinando la cantidad de él recuperada después de la extracción. Se observó que al añadir de 1 a 10 mg. de cloroquina a 100 ml. de orina se lograba casi una extracción completa. Cantidades menores de 1 mg. dieron sólo un rendimiento de 70 % aproximadamente. El umbral de sensibilidad cuantitativa de este método se calculó en 0,1 mg. de

* La precipitación obtenida a una elevada dilución produce una suspensión acuosa cuya densidad óptica puede medirse. Ejemplos de estos métodos nefelométricos no específicos utilizados para ensayar productos antimaláricos en fluidos del organismo son: todas las modificaciones del método de Mayer (3); el método de Foy y Kondi (15) (utilizando ácido silicotungsténico) para la determinación de la quinina; el método de Gentzkow (16) para la determinación de la atebрина; el método de Spinks (17) para la determinación de ciertas biguanidinas ("3349"); y el método de Fuhrmann (14) para la determinación de la cloroquina.

cloroquina por 100 ml. de orina. La lectura de ensayos en blanco en orina normal no reveló la menor turbiedad, salvo, ocasionalmente, una opalescencia apenas perceptible por debajo del valor del umbral de la curva de calibración (30 μg por 100 ml.). Para aumentar la estabilidad de la suspensión, Pereira y Paulini (22) modificaron la prueba de Fuhrmann agregando a la extracción final un 10% de una solución de celulosa carboximetilica.

Pocas dudas caben de que el método original de Fuhrmann puede simplificarse más utilizando sólo 50 ml. de orina, substituyendo el éter por querosén refinado, reduciendo de dos a uno el número de extracciones y utilizando frascos sencillos taponados, en lugar de embudos separadores. En Nigeria se están efectuando trabajos para adaptar este método a las condiciones de campo.

Pille y Lambourg (23) describieron un método colorimétrico sencillo ("Réaction colorée de Mayer"). En este método la cloroquina se reduce con hidrógeno y subsiguientemente se oxida con bicromato potásico para formar un compuesto rojo. La utilidad de esta prueba no ha sido determinada todavía.

Hace más de diez años se describieron dos métodos sensibles para el cálculo cuantitativo de cloroquina en fluidos biológicos. Uno de ellos se basa en la formación de un complejo orgánico soluble de base de cloroquina con heliantina (24), y el otro en la propiedad de la cloroquina de hacerse fluorescente al irradiarla con luz ultravioleta (25). Ambos métodos son bastante complicados, y ésta es probablemente la razón principal de que no se hayan empleado sobre el terreno.

Pinotti y Soares (26) reconocieron hace algunos años la necesidad de emplear la sal cloroquinada en algunas zonas del Brasil y de determinar la regularidad del consumo de la droga. Estos autores utilizaron los métodos cuantitativos de Brodie y obtuvieron una serie de datos valiosos sobre la excreción de la cloroquina incorporada a la sal común.

Más recientemente, Haskins (27) describió una variante simplificada del método de

heliantina de Brodie, que podría ser de valor sobre el terreno, aunque su sensibilidad no es mayor que la del método turbidométrico de Fuhrmann.

Si bien la excreción de cloroquina en la orina puede determinarse más o menos fácilmente y comprobarse la regularidad del consumo de la droga, el problema importante es muy distinto con respecto a la pirimetamina. Su contenido en fluidos biológicos puede valorarse mediante uno de los métodos hallados por Brodie y colaboradores (24, 25) o por la modificación de los mismos seguida por Schmidt, Hughes y Schmidt (28) o por otra más reciente adoptada por Clyde, Shute y Press (29). Estos métodos son menos adecuados para la determinación de la pirimetamina en la orina; además, todos ellos son complicados y no aplicables a usos de campo. No obstante, los resultados obtenidos en fecha reciente por Smith e Ihrig (30) muestran que estos ensayos tienen su valor. El método de Smith e Ihrig consiste en la extracción habitual de la base de pirimetamina de la orina alcalina por medio de bicloruro de etileno, reextracción del solvente orgánico mediante ácido clorhídrico y medición de la densidad óptica de la fase ácida en un espectrofotómetro ultravioleta. La orina normal contiene algunos compuestos químicos no específicos que tienen la misma absorción (a 270 $m\mu$) que la pirimetamina, y la excreción diaria de este material asciende al equivalente de unos 5 mg. de pirimetamina.

La pirimetamina se puede determinar también en la orina por medio de un método microbiológico (30) basado en que las sustancias neutralizantes de ácido fólico inhiben el crecimiento de *Streptococcus faecalis*, y la subsiguiente disminución de la turbiedad de la suspensión bacteriana puede expresarse como equivalente de pirimetamina a partir de una curva de calibración.

Es interesante señalar que, con los dos métodos utilizados con muestras alícuotas de orina de individuos que recibieron pirimetamina, Smith e Ihrig (30) obtuvieron resultados muy aproximados, con un error que no excedió de 3% en cualquiera de los

casos. El método microbiológico es mucho más sensible, pero no es exacto por debajo de un rendimiento diario de 0,5 mg. de pirimetamina.

Cuando se toma en forma de sal pirimetaminizada, la ingestión diaria de la droga asciende aproximadamente a 3-4 mg.; la pirimetamina es activa a estas pequeñas dosis, pero la cantidad de la droga y de sus metabolitos recuperables en la orina es demasiado pequeña para valoraciones químicas de la droga que merezcan confianza.

FISIOLOGIA DE LA ELIMINACION RENAL DE ALGUNOS PRODUCTOS ANTIMALARICOS

Al examinar este punto hay que aclarar que la excreción de productos antimaláricos depende, no sólo de su verdadera concentración en los fluidos del organismo, sino también de muchos otros factores. Por consiguiente, la cantidad de droga encontrada en la orina no puede utilizarse para el cálculo directo de su cantidad en el plasma o en los tejidos.

Haag, Larson y Schwartz (32) demostraron que la cantidad de quinina eliminada en la orina depende del equilibrio de ácido-base del individuo. La Unidad de Investigaciones Maláricas del Ejército, Oxford (33), observó que lo mismo ocurre con respecto a la atebrina y que la excreción de esta droga por los riñones guarda relación con la excreción de amoníaco y con la concentración de atebrina en el plasma. Este último hallazgo condujo a un excelente método de calcular indirectamente el nivel de atebrina en el plasma a partir de dos fórmulas empíricas basadas en el hecho de que la razón del contenido de atebrina urinaria a la del amoníaco urinario es proporcional a la concentración de atebrina en el plasma.

La influencia del equilibrio de ácido-base en la eliminación urinaria de cloroquina fue estudiada por Jailer *et al.* (34), quienes encontraron que la excreción diaria de la droga es por término medio el 24 % de la dosis de su ingestión diaria. La administración de bicarbonato sódico durante tres días hizo bajar el promedio diario de la excreción a

12,8 %, mientras que la acidificación, utilizando cloruro de amonio, lo aumentó a un 37 % de la ingestión diaria de la droga.

En un estudio de la absorción y excreción de varias drogas antimaláricas, Berliner *et al.* (35) confirmaron estos resultados e informaron que la cloroquina se excretaba en las heces en una proporción de 8 % de la dosis diaria de la droga, mientras que, en condiciones ordinarias, la excreción urinaria es por término medio del 14 % de la dosis diaria (margen de 10-25 %). Observaron, además, que la suerte metabólica de la cloroquina varía según las personas, si bien, por lo general, se excreta alrededor del 25 % de la droga, mientras que el resto pasa por una degradación lenta.

La cantidad dada a conocer de base de cloroquina excretada en la orina, varía según el método utilizado y la técnica de investigación. Los porcentajes de excreción urinaria de la cantidad total de cloroquina administrada, fueron los siguientes: Jailer *et al.* (34), 24 %; Berliner (35), 14 %; Fuhrmann y Koenig (19), 17 %; Pinotti y Soares (26), 29 %; y Bruce-Chwatt y Gibson (21), 20 %.

Según Wilson y Edeson (18), la prueba turbimétrica de cloroquina en la orina se convierte en positiva dentro de las 12 horas después de administrar una sola dosis de 600 mg. y permanece positiva en la mayoría de los pacientes durante 5 ó 6 días. Haskins (27) observó que, después de la administración de 300 mg. de la droga, la prueba modificada de heliantina se convierte en positiva a las 4 ó 5 horas, permanece firmemente positiva durante 4 ó 5 días y disminuye lentamente en intensidad hasta hacerse indistinguible del ensayo en blanco al 10° día. Bruce-Chwatt y Gibson (21) observaron que la prueba turbimétrica después de una dosis de 300 mg. daba la cifra más elevada (10 % de ingestión) 24 horas después de la administración, cifra que disminuía gradualmente hasta el 1 % de la ingestión al 5° ó 6° día y se convertía en negativa al 9° día.

Son todavía muy pocos los datos disponibles sobre la excreción de pirimetamina en

la orina después de administrarla al hombre por vía oral. Los primeros informes de Goodwin (31) mencionaban una rápida excreción de la droga. Más recientemente, Smith e Ihrig (30) dieron cuenta de que, después de la administración de 100 ó 200 mg. de pirimetamina durante 2 días, la excreción diaria durante los primeros 5 días fue de un promedio de 12% de la ingestión.

Según se determinó por método químico, la cantidad de pirimetamina (o su metabolito) excretada diariamente después de una ingestión de 100 mg. fue la siguiente: al 2º día después de la administración, 3,4 mg.; al 3º día, 2 mg.; al 4º día, 2,4 mg.; al 5º día, 2,3 mg.; al 8º día, 1,5 mg. Algunos individuos excretaron cantidades de pirimetamina químicamente mensurables (aproximadamente el 1% de 1 mg. en 24 horas) al 11º día después de la administración. La presencia de la droga (o de su metabolito) se pudo descubrir después de 15 días mediante el ensayo microbiológico, más sensible aunque menos exacto, y se encontraron indicios de sustancias antifólicas en la orina de un individuo un mes después de la administración de 200 mg. de pirimetamina. Cualquier método de análisis cuantitativo para la determinación del contenido de droga antimalárica en la orina, suele complicarse por el hecho de que la excreción debería medirse en un período de 24 horas, en relación con el rendimiento urinario diario. Naturalmente, esto resulta muy difícil en condiciones de campo; en cambio, la obtención de muestras sueltas al azar es fácil.

Pinotti y Soares (26), en Brasil, compararon la excreción de cloroquina en muestras individuales de orina (evacuadas en la mañana) con la orina recogida durante 24 horas y observaron que las diferencias individuales eran considerables, a pesar de haberse empleado medios bastante análogos. El método ideado por Yudkin (36) en Sierra Leona permite hacer una determinación de la tasa de excreción con una sola muestra tomada al azar y se puede utilizar para determinar valores "estándar" de excreción. La concentración urinaria "estándar" se define como

la concentración relacionada con el peso específico de la orina (1,010). La fórmula de conversión es la siguiente:

Concentración estándar =

$$\frac{\text{Concentración verdadera} \times 10}{\text{Peso específico de la muestra} - 1}$$

Así, por ejemplo, si una muestra de orina que contiene 3 mg. por 1000 ml. de cloroquina tiene un peso específico de 1,020, la concentración "estándar" sería la siguiente:

$$\frac{30}{1000 \times 0,02} = 1,5 \text{ mg. por } 1000 \text{ ml.}$$

El Método de Yudkin se ensayó en Africa Occidental durante la determinación de concentraciones de atebрина en la orina, y se observó que daba unos valores muy uniformes y que era tan buen índice de excreción de la droga como el rendimiento total de atebрина en 24 horas. Parece ser que puede utilizarse ventajosamente para la comprobación cuantitativa de la excreción de cloroquina en el campo.

CONCLUSIONES

La determinación de la excreción en la orina de productos antimaláricos para comprobar la regularidad y dosificación de la administración de drogas sobre el terreno es de considerable utilidad. Pero no es fácil su empleo efectivo en gran escala a causa de los aspectos técnico y administrativo del problema.

Dos de los métodos cualitativos conocidos para la determinación de la cloroquina en la orina tienen interés, a saber: a) el método de Fuhrmann, que utiliza el reactivo de Mayer-Tanret, es rápido, sencillo y sensible, pero está sujeto a errores; b) el método colorimétrico de Haskins, ligeramente más complicado, pero aun sencillo, es un poco más específico, pero no más sensible que el precedente. Ambos métodos deben evaluarse en mayor escala para poder determinar su utilidad en la práctica.

La prueba de bicromato potásico, recomendada por Pille y Lambourg, está pendiente de una mejor apreciación, aunque es

dudoso que suponga una mejoría en relación con los dos métodos ya mencionados.

Pocas dudas caben de que el método de Brodie y sus colaboradores (24, 25) es mucho más sensible que cualquiera de las demás pruebas conocidas, pero también es el más complicado y difícil de utilizar en la práctica. En cambio, el método turbimétrico de Fuhrmann (14), si bien menos sensible y menos específico, es mucho más sencillo y se puede utilizar sin gran dificultad en la práctica. Este método podría simplificarse más, sin gran pérdida de sensibilidad.

La aplicación del principio de la concentración "estándar" de la droga, permitiría hacer una mejor comparación de las diferentes muestras en circunstancias en que no es posible recoger la orina durante 24 horas.

Los actuales métodos de determinación de pequeñas cantidades de pirimetamina en fluidos biológicos no son adecuados para usos de campo. La droga es activa a una dosificación tan baja que los métodos de su determinación química en la orina no son factibles en la práctica.

Anexo

DESCRIPCION DE ALGUNAS PRUEBAS DEL CONTENIDO DE CLOROQUINA EN LA ORINA

Prueba de Wilson y Edeson (18)

Una prueba cualitativa basada en el reactivo de Mayer-Tanret.

Reactivo:

HgCl ₂	6,8 g.
KI.....	24,9 g.
H ₂ O.....	500 ml.

Método. Se agregan unas gotas de reactivo de Mayer-Tanret a unos pocos mililitros de orina clara reciente. Se produce una turbiedad blanquinosa que desaparece al calentar la orina y reaparece cuando se enfría. Si hay albúmina, la turbiedad aumenta al calentar la orina. No obstante, la prueba se puede llevar a cabo eliminando la albúmina por medio de ebullición y subsiguiente filtración. Según Pille y Lambourg (23), la prueba es más sensible si la orina está fría (media hora en el refrigerador). La sensibilidad de la prueba es aproximadamente de 1:250.000 a 1:100.000 (0,4-1,0 mg. por 100 ml.).

Prueba de Haskins (27)

Prueba cualitativa basada en el método de Brodie y Udenfriend (24)

Reactivos:

- Solución de hidróxido de sodio al 10%;
- Cloroformo o dicloruro de etileno, purificados;
- Solución de heliantina (preparada mediante la disolución de 0,1 g. de he-

liantina—grado del indicador—en una solución de ácido bórico al 5%, y agitando. A las pocas horas se filtra la solución y el filtrado claro se utiliza como reactivo).

Método. Se agrega 1 ml. de solución de hidróxido de sodio y 5 ml. de cloroformo a un tubo de ensayo que contenga 5 ml. de orina. Se tapa el tubo y se agita durante un minuto y se dejan separar las capas (puede ser necesaria la centrifugación). La capa de sobrenadante se extrae con una pipeta y el cloroformo se transfiere cuidadosamente a un tubo limpio; se añaden luego al cloroformo 0,5 ml. de solución de heliantina, el tubo se tapa y se agita durante 20 segundos y se deja que se separen las capas. La orina que contiene 0,2 mg. de cloroquina por 100 ml. da una reacción perceptible; la que contiene 0,5 mg. por 100 ml. produce un definido color amarillo, y la que contiene 1,0 mg por 100 ml. da un color amarillo intenso. Como control, debe también hacerse la prueba con una muestra de orina libre de cloroquina y de cualquier otro compuesto orgánico básico (quinina, plasmocina, codeína, benedrina, efedrina, petidina).

Prueba de Fuhrmann (14)

Prueba cuantitativa modificada por Bruce-Chwatt y Gibson (21).

Reactivos:

- Yoduro de mercurio (HgI₂), 2,7 g. disueltos en 150 ml. de agua;

- b) Yoduro potásico (KI), 10 g. disueltos en 50 ml. de agua destilada caliente;
- c) Una mezcla de las dos soluciones anteriores más 2,5 ml. de ácido acético puro (este reactivo permanece estable durante unos tres meses).

Método. Se hierven y filtran 100 ml. de orina para eliminar toda la albúmina que puedan contener. El filtrado frío se prepara en 100 ml. con agua destilada y alcalinizada con 5 ml. de hidróxido de potasio al 50%. Se añaden 100 ml. de éter y se agitan en un embudo separador. Se repite esta operación y se juntan los dos extractos de éter y se lavan en un embudo separador con 25 ml. de agua destilada. La base de cloroquina se extrae luego del éter agitándola primero con 25 ml. y después con 15 ml. de ácido sulfúrico 0,2 N. Luego se mezclan las dos fracciones de los extractos de ácido sulfúrico, se calientan al baño de María para eliminar cualquier resto de éter y se preparan con ácido sulfúrico 0,2 N a un volumen estándar de 50 ml.

La adición de 1 ml. de reactivo de Mayer-Tanret a 10 ml. del extracto de ácido sulfúrico produce un grado de turbiedad mayor o menor según la cantidad de sal de cloroquina presente en el extracto. La turbiedad puede medirse con un absorciómetro (o cualquier colorímetro que pueda utilizarse como nefelómetro) y la cantidad de cloroquina de la solución puede calcularse a base de una curva de calibración preparada con las cantidades de sulfato de cloroquina. (Se espera que será posible preparar discos estándar utilizables con un comparador de Lovibond). Como en la mayoría de los métodos turbidimétricos, el tiempo de lectura debe estandarizarse a los 10 minutos después de agregar el reactivo de Mayer-Tanret, puesto que la suspensión turbia permanece estable sólo por breve tiempo y su densidad óptica disminuye con el aumento gradual del tamaño de las partículas.

Prueba turbidimétrica modificada (según Pereira y Paulini (22))

Una prueba cuantitativa que da mayor estabilidad a la suspensión

Reactivos:

- a) Hidróxido de sodio, 0,5 N;
- b) Hexano (éter de petróleo);
- c) Acido clorhídrico, 0,1 N;

- d) Solución al 1% de celulosa carboximetilica;
- e) Reactivo Mayer-Tanret

Método. Se agregan 5 ml. de solución de hidróxido de sodio y 25 ml. de hexano a 5 ml. de orina. Se agita esta mezcla durante 30 minutos y, de producirse emulsión, se agregan unas gotas de alcohol puro. Se centrifuga por 2 minutos y se extrae la orina con una pipeta. Se enjuaga la solución de hexano dos veces, en cada ocasión con 3 ml. de solución de hidróxido de sodio. Se extrae con una pipeta el enjuague del hidróxido de sodio, y se le agrega al hexano 10 ml. de ácido clorhídrico y se agita durante 15 minutos. Se extraen con una pipeta 9 ml. de ácido clorhídrico y se les agrega 1 ml. de celulosa carboximetilica y 0,2 ml. de reactivo Mayer-Tanret. Se agita durante 10 segundos y se deja asentar de 50 a 60 minutos antes de medir la turbiedad. Para la medición óptica de la turbiedad los autores de esta prueba utilizaron el colorímetro de Lumitron de lectura directa, con un filtro de 40 μ . Con esta prueba se obtiene resultados satisfactorios siempre que se use la proporción de 0,1 a 0,8 mg. de cloroquina por 100 ml. de orina.

Método fluoroscópico simple (según Pille y Lambourg (23))

Prueba cualitativa y cuantitativa.

Reactivos:

- a) Hidróxido de potasio, 25%;
- b) Eter;
- c) Acido sulfúrico, 1%

Método. Se agitan 50 ml. de orina en un embudo separador con 5 ml. de KOH al 25% y 50 ml. de éter. Se separa el éter sobrenadante y se agita con 10 ml. de H₂SO₄ al 1%. Se separa la solución de ácido sulfúrico y se calienta al baño de María para eliminar el éter disuelto. La solución muestra una intensa fluorescencia verdosa cuando se expone a la luz ultravioleta. La intensidad de la fluorescencia puede compararse con muestras calibradas de soluciones ácidas de cloroquina.

Método colorimétrico (según Pille y Lambourg (23))

Prueba cualitativa.

Reactivos:

- (a) Acido sulfúrico, 10%;
- (b) Polvo de cinc, metálico;
- (c) Bicromato potásico, solución 1:1000

Método. Se agregan 4 ml. de ácido sulfúrico y 0,5 g. de polvo de cinc metálico a 50 ml. de orina. Esta mezcla se calienta al baño de María y se agita de vez en cuando durante 10 minutos; se

filtra y se deja enfriar, y se añaden suavemente *unas gotas* de solución de bicromato potásico a 2 ml. del filtrado. La cloroquina produce un anillo rojo vivo.

REFERENCIAS

- (1) Bruce-Chwatt, L. J.: *Bull. Wld. Hlth Org.*, 15:852, 1956.
- (2) League of Nations, Malaria Commission: *Bull. Hlth. Org. L.o.N.*, 6:895, 1937.
- (3) Mayer, W.: *Jour. Prakt. Chem.*, 9:246, 1832.
- (4) Tanret, J.: *Jour. Pharm. Chim.* (Paris), 28:490, 1909.
- (5) Nierenstein, M.: En: Ross, E., ed., *Observations on malaria*, Londres (War Office publication) 1919.
- (6) Mission antipaludique de l'Armée d'Orient: *Bull. Soc. Path. Exot.*, 11:456, 1918.
- (7) Wenyon, C. M.: *Jour. Roy. Army Med. Cps.*, 37:83, 1921.
- (8) Castellani, A.: *Jour. Roy. Soc. Arts*, 86:875, 1936.
- (9) Howie, J. W., y Murray-Lyon, R. M.: *Lancet*, 2:317, 1943.
- (10) Yudkin, J.: *Jour. Trop. Med. & Hyg.*, 48:1, 1945.
- (11) Peter, F. M.: *Ergebn. Hyg. Bakt.*, 20, 1937.
- (12) Gage, J. C., y Rose, F. L.: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 40:333, 1946.
- (13) Gilroy, A.: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 46:72, 1952.
- (14) Fuhrmann, G.: *Z. Tropenmed. Parasit.*, 2:279, 1950.
- (15) Foy, H., y Kondi, A.: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 29:497, 1935.
- (16) Gentzkow, C. J.: *Am. Jour. Trop. Med.*, 18:149, 1938.
- (17) Spinks, A.: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 39:183, 1945.
- (18) Wilson, T., y Edeson, J. F. D.: *Med. Jour. Malaya*, 9:115, 1954.
- (19) Fuhrmann, G., y Koenig, K.: *Z. Tropenmed. Parasit.*, 6:431, 1955.
- (20) Charles, L. J.: Dato inédito, 1957.
- (21) Bruce-Chwatt, L. J., y Gibson, F. D.: *Brit. Med. Jour.*, 1:894, 1959.
- (22) Pereira, J. P., y Paulini, E.: *Rev. Bras. Malar.*, 8:613, 1956.
- (23) Pille, G., y Lambourg, J.: *Méd. Trop.*, 18:131, 1958.
- (24) Brodie, B. B. y Udenfriend, S.: *Jour. Biol. Chem.*, 158:705, 1945.
- (25) Brodie, B. B., Udenfriend, S., Dill, W. y Downing, G.: *Jour. Biol. Chem.*, 168:311, 1947.
- (26) Pinotti, M., y Soares, R.: *Rev. Bras. Malar.*, 8: 253, 1956.
- (27) Haskins, W. T.: *Am. Jour. Trop. Med. & Hyg.*, 7:199, 1958.
- (28) Schmidt, L. M., Hughes, H. B., y Schmidt, I. G.: *Jour. Pharmacol. Exp. Ther.*, 107:92, 1953.
- (29) Clyde, D. F.: Shute, G. T., y Press, J.: *Jour. Trop. Med. & Hyg.*, 59:277, 1956.
- (30) Smith, C. S., y Ihrig, J.: *Am. Jour. Trop. Med. & Hyg.*, 6:52, 1957.
- (31) Goodwin, J. G.: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 46:485, 1952.
- (32) Haag, H. B.; Larson, P. S., y Schwartz, J. J.: *Jour. Pharmacol. Esp. Ther.*, 79:136, 1943.
- (33) Army Malaria Research Unit, Oxford: *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 39:53, 1945.
- (34) Jailer, J. W.; Rosenfeld, M., y Shannon, J. R.: *Jour. Clin. Invest.*, 28:1168, 1947.
- (35) Berliner, R. W.; Earle, D. P., Jr.; Taggart, J. V.; Zubrod, C. G.; Welch, W. J.; Conan, N. J.; Bauman, E.; Scudder, S. T., y Shannon, J. A.: *Jour. Clin. Invest.*, 27, No. 3, Parte 2, pág. 98, 1948.
- (36) Yudkin, J.: *Lancet*, 1:377, 1946.