



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA

**MITIGACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS DE NITROFURANTOÍNA
ADMINISTRADA POR VÍA ORAL UTILIZANDO UN EXTRACTO SECO
ESTANDARIZADO DE *BUDDLEJA GLOBOSA* HOPE (MATICO).**

Director

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología y
Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Patrocinante

Prof. María Eugenia Letelier M.
Laboratorio de Farmacología y
Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Memoria de Título para optar al título de Químico Farmacéutico

FELIPE AUGUSTO HIDALGO CASTRO

Santiago de Chile

2012

*A Dios, a la vida y el destino,
Por haberme situado en esta senda.
Lo que puedas llegar a aspirar,
Sólo está limitado por el tamaño de tus sueños.*

Agradecimientos

Primero que todo quiero agradecer a mis padres, por su apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y en las decisiones que he tomado a lo largo de los años. A mi madre por ser mi pilar fundamental, por haber aprendido con ella las cosas más importantes en mi vida, gracias a ella estoy aquí, agradezco a Dios haberme dado una madre tan excepcional como ella. A mi padre por su constante preocupación, por su apoyo y cariño, por siempre estar pendiente de mi bienestar y demostrar tanto interés en mis estudios. Y a ambos por haberme enseñado que para ser una familia no es necesario vivir juntos bajo un mismo techo.

A mis tíos, padrinos, primos y familiares por desearme siempre lo mejor, a pesar de la distancia y las adversidades siempre hemos sido unidos.

A mis compañeros y amigos de universidad, Rodrigo, Carla, David, Karina, Marlene, Rodolfo, Patricio, Inelia, Natalia, Elizabeth y Esteban que desde un principio hicieron que la experiencia de la Universidad sea una de las más bellas de mi vida hasta la fecha. Muchas gracias por su apoyo, compañerismo, risas y comprensión, disfruto plenamente su compañía y siempre serán buenos momentos cuando estemos juntos.

Este trabajo no podría haberse llevado a cabo sin el apoyo y colaboración de muchas personas, entre ellos, la Sra. Ximena Polanco, el Dr. Enrique Ossandon, la Enfermera Tamara Torres, Miguel López, Javiera Brunner, Romy Gutmann, Josefa González, Paula Aracena y a todas las pacientes que colaboran en este estudio.

A mis compañeros del laboratorio de farmacología y toxicología; Valentina, Carmen Luz, Daniel y Andrea por hacer las horas de trabajo en el laboratorio

mucho más agradables, a Don José Riquelme por su compañía y en especial quisiera agradecer a la profesora María Eugenia Letelier directora del laboratorio y directora de esta tesis, por creer en mí y mis conocimientos, por preocuparse de mi desarrollo tanto personal como profesional y por considerarme como uno de sus hijos postizos, de lo cual me siento plenamente orgulloso.

ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| ITU | : Infección Tracto Urinario |
| FRAP | : Capacidad Plasmática Reductora de Hierro |
| MDA | : Malondialdehído |
| RAM | : Reacción Adversa Medicamentosa |
| TBARS | : Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico |
| UFC | : Unidades Formadoras de Colonias |
| ISP | : Instituto Salud Pública |

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|--|---------------|
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| ABREVIATURAS..... | v |
| ÍNDICE GENERAL..... | vi |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | vii |
| INDICE DE TABLAS..... | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| SUMMARY..... | xi |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Hipótesis..... | 5 |
| Objetivo general..... | 5 |
| Objetivos específicos..... | 5 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 6 |
| Materiales..... | 6 |
| Metodología..... | 6 |
| Selección de pacientes..... | 7 |
| Criterios de inclusión..... | 7 |
| Criterios de exclusión..... | 7 |
| Distribución de pacientes..... | 7 |
| Metodología para el paciente..... | 8 |
| Toma de muestras de sangre y orina..... | 9 |
| Evaluación de reacciones adversas medicamentosas..... | 10 |
| Determinación de la capacidad antioxidante plasmática..... | 10 |
| Determinación de MDA plasmático..... | 11 |
| Análisis estadísticos..... | 11 |

| | |
|--|----|
| III. RESULTADOS..... | 12 |
| Caracterización del grupo de pacientes..... | 12 |
| Eficacia del tratamiento de nitrofurantoína..... | 14 |
| Hemograma y perfil bioquímico..... | 15 |
| Capacidad antioxidante plasmática..... | 16 |
| Aparición y severidad de las reacciones adversas intestinales asociadas a la administración oral de nitrofurantoína..... | 19 |
| IV. DISCUSIÓN..... | 25 |
| V. CONCLUSIONES..... | 27 |
| VI. REFERENCIAS..... | 28 |
| VII ANEXOS..... | 34 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1: Metabolismo reductivo de la nitrofurantoína y producción de especies reactivas de oxígeno..... | 3 |
| FIGURA 2: Caracterización etaria de los pacientes incluidos en el estudio.. | 13 |
| FIGURA 3: Presencia de dolor abdominal en pacientes tratados con nitrofurantoína asociada a placebo o BG126 [®] | 20 |
| FIGURA 4: Figura 4. Presencia de náusea en pacientes tratados con nitrofurantoína asociada a placebo o BG126 [®] | 22 |
| FIGURA 5: Presencia de diarrea en pacientes tratados con nitrofurantoína asociada a placebo o BG126 [®] | 23 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1: Eficacia del tratamiento..... | 15 |
| TABLA 2: Parámetros del hemograma..... | 17 |
| TABLA 3: Parámetros del perfil bioquímico..... | 18 |
| TABLA 4: Estado redox plasmático..... | 19 |
| TABLA 5: Análisis de contingencia: dolor abdominal..... | 21 |
| TABLA 6: Análisis de contingencia: náusea..... | 22 |
| TABLA 7: Análisis de contingencia: diarrea..... | 24 |

RESUMEN

MITIGACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS DE NITROFURANTOÍNA ADMINISTRADA POR VÍA ORAL UTILIZANDO UN EXTRACTO SECO ESTANDARIZADO DE *Buddleja globosa* HOPE

La nitrofurantoína es un antibiótico derivado del nitrofurano utilizado como fármaco de primera elección para el tratamiento de infecciones del tracto urinario. Sin embargo, este fármaco produce serios efectos adversos principalmente de origen gastrointestinal. Se postula que las reacciones adversas se deberían al estrés oxidativo provocado por la nitroreducción de la nitrofurantoína que genera especies reactivas del oxígeno. Por lo tanto, BG126[®], preparado herbal a base de hojas de *Buddleja globosa* Hope, podría mitigar los efectos adversos de nitrofurantoína; este fitofármaco se ha caracterizado por su alta actividad antioxidante (datos aún no publicados).

Los resultados de este estudio clínico doble ciego y randomizado, mostraron que el tratamiento asociado de nitrofurantoína (200mg/día) y BG126[®] (2 cápsulas/día), efectivamente disminuyó los efectos adversos gastrointestinales de pacientes mujeres con infección bacteriana del tracto urinario (ITU). Entre estas reacciones adversas se cuantificó náusea, dolor abdominal y diarrea. Más aún, este tratamiento conjunto potenció la actividad antibacteriana de la nitrofurantoína; al final del tratamiento, todos los pacientes que recibieron nitrofurantoína y BG126[®] presentaron urocultivos negativos, mientras que el 19% de los pacientes que recibieron sólo nitrofurantoína mostraron urocultivos positivos, lo cual indica la presencia de cepas bacterianas resistentes a nitrofurantoína.

Cabe destacar que la capacidad antioxidante plasmática de ambos grupos de pacientes no fue significativamente diferente. Así, no se observaron diferencias significativas en la capacidad reductora de hierro, ni en los niveles de MDA de

ambos grupos de pacientes, el que recibió sólo nitrofurantoína y aquel que recibió en forma conjunta nitrofurantoína y BG126[®]. Estos resultados parecen indicar que la absorción de BG126[®] es baja y por tanto, el efecto observado es mayoritario a nivel de la pared gastrointestinal.

El aumento de la resistencia a antibióticos de las diferentes cepas bacterianas que infectan al hombre, es un problema de salud pública a nivel mundial. Si sumamos a lo anterior, las reacciones adversas de los fármacos antibacterianos, como son los derivados de nitrofuranos, las estrategias terapéuticas contra las diversas infecciones bacterianas se ven muy limitadas. Interesantemente, BG126[®] no sólo disminuyó la severidad de las reacciones adversas provocadas por la nitrofurantoína, sino que al parecer potenció su efecto antibacteriano. Nuevos experimentos están en proceso con el objeto de dilucidar los mecanismos que permitan explicar el comportamiento antibacteriano de nitrofurantoína comparada con la mezcla nitrofurantoína-BG126[®].

A STANDARDIZED DRIED EXTRACT OF *BUDDLEJA GLOBOSA* HOPE, BG126[®], MITIGATES THE ADVERSE DRUG REACTIONS INDUCED BY ORAL ADMINISTRATION OF NITROFURANTOIN

Nitrofurantoin is an antimicrobial drug specially selected for treatment of the urinary tract infections. However, this therapy produces severe adverse reactions, mainly in the gastrointestinal tract. It has been postulated that the adverse reactions induced by nitrofurantoin are originated through its reductive metabolism. This drug suffers nitroreduction, reaction which generate reactive oxygen species and so, oxidative stress. Since, the preparation of *Buddleja globosa* Hope leaves, BG126[®], may mitigate the nitrofurantoin adverse reactions; this phytodrug has a high antioxidant activity (date unpublished).

The results of this randomized double-blinded clinical trial, showed that the associated treatment of nitrofurantoin (200mg/día) and BG126[®] (2 capsules/day), in fact, decrease the gastrointestinal nitrofurantoin adverse reactions in woman patients with urinary tract infection (UTI). Among them, we measured nausea, abdominal pain and diarrhea. Moreover, this associated treatment potentiated the nitrofurantoin antibacterial activity; at the end of the treatment, all of the patients that received nitrofurantoin and BG126[®] showed negatives urocultures, while 19% of the patients that received only nitrofurantoin showed positives urocultures, so indicating the presence of nitrofurantoin resistant bacterial strains.

It's important to highlight that the plasmatic antioxidant capacity of both groups of patients were not significantly different. We did not observed significant differences in the ferric reducing ability of plasma and in the levels of plasmatic MDA of both patients groups that received only nitrofurantoin and that received

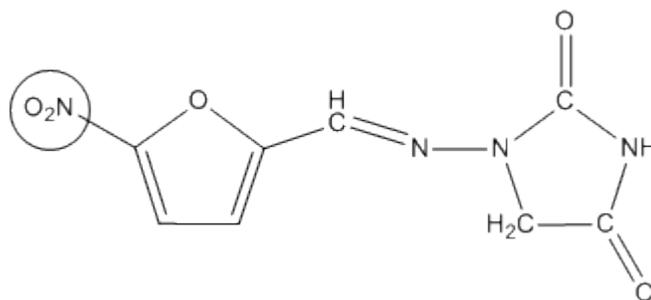
nitrofurantoin and BG126[®]. These results suggest that BG126[®] absorption was low and the main effect was on the gastrointestinal wall.

It is necessary to note that the antibacterial resistance in several of bacteria's strains that infects human beings has increased and is a worldwide public health problem. In addition, many of antibacterial drugs induce severe adverse reactions, between them the nitrofurans derivatives. These data have provoked a decrease in the therapeutic strategies against the bacterial infections. BG126[®] not only decreased the severity of the adverse drug reactions due to nitrofurantoin, it also apparently enhanced the antibacterial effect. New experiments are in process with the aim to elucidate the mechanisms involved in the antibacterial effects of nitrofurantoin associated to BG126[®] observed.

I. INTRODUCCIÓN

La nitrofurantoína [N-(5-Nitro-2-furfurylidene)-1-aminohydantoin] es un antibiótico derivado del nitrofurano utilizado en el tratamiento y en la profilaxis de infecciones de las vías urinarias. Nitrofurantoína tiene una alta biodisponibilidad en el tracto urinario y una baja frecuencia de desarrollo de resistencia hacia bacterias patógenas que atacan la vía urinaria [1]. Su mecanismo de acción es poco conocido, pero se cree que actuaría inhibiendo diversos mecanismos enzimáticos bacterianos [2]. Así, en bacterias susceptibles las nitroreductasas convierten a la nitrofurantoína en electrófilos altamente reactivos, los cuales atacan los ribosomas e inhiben la síntesis de proteína de las bacterias [3].

La incidencia de las infecciones del tracto urinario (ITU) es mayor en las mujeres que en los hombres. Más aún, 40 a 50% de las mujeres presentan alguna vez en su vida este tipo de infección [4]. La nitrofurantoína sin embargo, provoca reacciones adversas de considerable intensidad. Estas reacciones principalmente involucran trastornos digestivos, y en menor grado, fibrosis pulmonar [5], daño hepático [6], polineuropatía periférica [7], desórdenes hematológicos [8]. En humanos, la toxicidad pulmonar y hepática ha sido atribuida a los intermediarios reactivos generados por la nitroreducción de la nitrofurantoína [9-10].



La nitroreducción enzimática de la nitrofurantoína involucra la transferencia de uno o dos electrones desde FADH o NADPH a la nitrofurantoína, respectivamente. Si la reducción es mono electrónica se genera un nitroanión radical ($-\text{NO}_2^{\cdot-}$), el cual es capaz de reciclar con el O_2 regenerando la nitrofurantoína [11-12]. Este reciclaje redox produce anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) el cual dismuta a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 en presencia de metales redox activos tales como el hierro y el cobre, produce radicales hidroxilos (HO^{\cdot}) [13-14]. Estas especies reducidas del O_2 provocan estrés oxidativo que conlleva a la oxidación de biomoléculas tales como lípidos, proteínas y DNA [15]. En células de mamíferos se ha visto que varias reductasas participan en la nitroreducción de la nitrofurantoína, entre ellas la citocromo P450 reductasa, enzima que forma parte del sistema oxidativo CYP450 [16-18].

Efectos adversos y cumplimiento de la terapia antimicrobiana. La terapia de las infecciones del tracto urinario bajo con nitrofurantoína presenta una alta tasa de no cumplimiento; esto debido principalmente a las reacciones adversas producidas por este fármaco. Se postula que las reacciones adversas se deberían al estrés oxidativo provocado por la nitroreducción de la nitrofurantoína [19]. El control del estrés oxidativo es de especial relevancia en pacientes mujeres de tercera edad, ya que los efectos adversos de nitrofurantoína se acentúan en ellos por el deterioro fisiológico propio del envejecimiento.

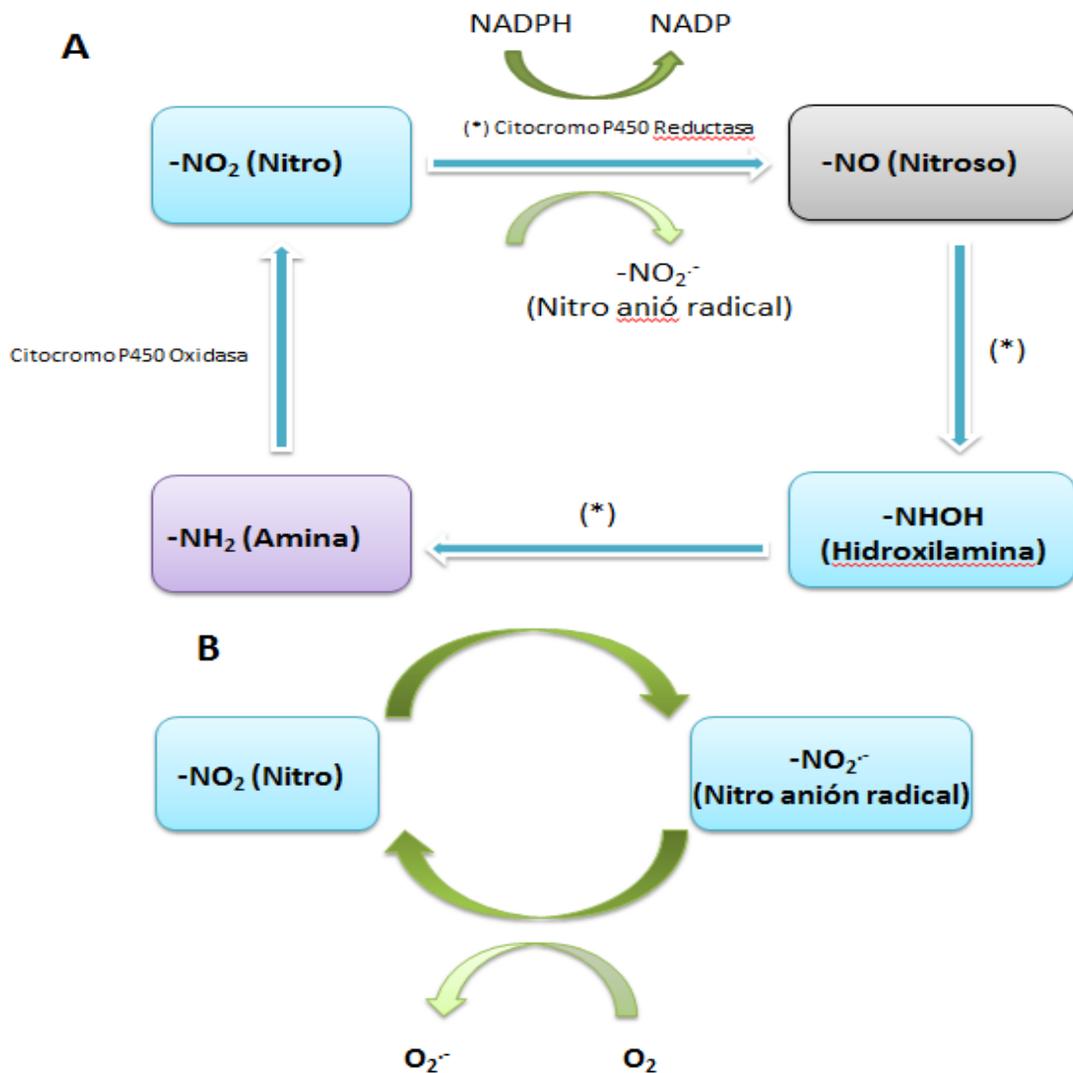


Figura 1. Metabolismo reductivo de la Nitrofurantoína y producción de especies reactivas de oxígeno. A. Nitrofurantoína puede ser reducida a través de varias etapas. Primero es reducida al derivado nitroso., el cual luego se reduce a hidroxilamina, especie farmacológicamente activa. La hidroxilamina posteriormente se reduce a amina la cual puede ser nuevamente oxidada a nitrofurantoína. **B.** El paso de -nitro a -nitroso derivado genera un intermediario radicalario ($-\text{NO}_2^{\cdot-}$); este intermediario puede reciclar con el oxígeno molecular generando anión superóxido, radical que puede provocar estrés oxidativo.

Existen antecedentes de terapias antioxidantes en enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, patologías especialmente asociadas a estrés oxidativo [20-22]. Como se mencionó anteriormente las reacciones adversas inducidas por la administración oral de nitrofurantoína, serían originadas por el estrés oxidativo inducido por su nitroreducción. Es por ello que en este trabajo se postula que estas reacciones adversas pueden ser mitigadas al administrar conjuntamente nitrofurantoína y BG126[®], un preparado estandarizado de hojas de *Buddleja globosa* Hope (Matico). BG126[®] está estandarizado bajo protocolos de producción, es un producto patentado cuya propiedad pertenece a la empresa Laboratorios Ximena Polanco y como tal está registrado en el ISP.

El matico planta nativa chilena figura entre las plantas más recomendadas en el manejo de las heridas de la piel, patologías gastrointestinales, hepáticas y vesiculares [23]. Por otra parte, se sabe que las hojas de matico tienen un alto contenido de polifenoles, compuestos de reconocida actividad antioxidante, antiinflamatoria y cicatrizante [24-28]. Se han destacado las cualidades reparativas de matico en piel y mucosas, sugiriendo el empleo de la infusión, polvos, cocimientos, compresas, lavados y pomadas de matico para la curación de heridas, y la infusión para úlceras y trastornos digestivos [29-31]. Respecto a su toxicología, estudios de toxicidad aguda en ratones, han mostrado que la administración oral del extracto crudo de *Buddleja globosa*, hasta 2 g/Kg e intraperitoneal hasta 600 mg/Kg, no evidencia efectos tóxicos [32].

Estos antecedentes parecen indicar que la capacidad antioxidante de matico podría estar involucrada en el efecto reparador de heridas y/o procesos inflamatorios gastrointestinales. Por lo tanto, el preparado utilizado en estos estudios podría favorecer la mitigación de efectos adversos gastrointestinales ligados a la administración de nitrofurantoína.

HIPÓTESIS

El tratamiento oral conjunto de BG126[®] y nitrofurantoína administrado a pacientes mujeres con infección del tracto urinario bajo, mitiga los efectos adversos provocados por el tratamiento con sólo nitrofurantoína.

OBJETIVOS

Objetivo General

Comprobar la capacidad del extracto BG126[®] de mitigar los efectos adversos gastrointestinales provocados por la administración oral de nitrofurantoína a pacientes mujeres con infección del tracto urinario bajo.

Objetivos Específicos

Evaluar los 2 grupos de pacientes: **Grupo A:** tratado con nitrofurantoína y excipiente y **Grupo B:** tratado con nitrofurantoína y BG126[®], respecto de:

1. Posibles reacciones adversas gastrointestinales que se evaluarán mediante el seguimiento farmacéutico. Las reacciones adversas a evaluar se encuentran incluidas en el **ANEXO 1**.
2. Los parámetros incluidos en los análisis de perfil bioquímico y hemograma.
3. La capacidad plasmática reductora de hierro (FRAP) y malondialdehído (MDA) plasmático.
4. Correlacionar las variables evaluadas mediante un test que permita determinar la significancia estadística de las diferencias obtenidas entre los grupos de pacientes A y B.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Nitrofurantoína: Para este trabajo se utilizaron comprimidos de 100 mg de nitrofurantoína micro-cristales del Laboratorio Mintlab Co. S.A, las que fueron donadas por Droguería Nacional.

Cápsulas de Matico: Las cápsulas de BG126[®] que contenían extracto seco de hojas de matico y las de placebo que contenían el excipiente (maltodextrina) fueron proporcionadas por Laboratorios Ximena Polanco. Las características del extracto de matico utilizado en la formulación de las cápsulas de BG126[®] están descritas en el **ANEXO 2**.

Toma de muestras: Para la toma de muestra de utilizaron tubos de 5 mL. Vacutainer Becton Dickinson con EDTA para hemograma; tubos de 5 mL Vacutainer Becton Dickinson para perfil bioquímico; mariposas para Vacutainer Becton Dickinson 21G ³/₄; algodón hidrófilo; alcohol 95%.

METODOLOGIA

Descripción del Trabajo: Ensayo clínico, doble ciego randomizado aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Copia de la aprobación de este proyecto se acompaña en los **ANEXO 3 Y ANEXO 4**.

SELECCIÓN DE PACIENTES

Los pacientes fueron reclutados durante el segundo semestre del año 2011 y el primer semestre del año 2012. Si bien el proyecto clínico fue aprobado el año 2009, este proyecto formó parte del proyecto FONDECYT N° 1109015 y en la carta GANT de dicho proyecto el estudio clínico estaba propuesto a ser realizado el año 2012.

Criterios de Inclusión

- Sexo femenino con diagnóstico de infección del tracto urinario bajo (ITU). Urocultivo positivo con más de 100.000 UFC y sensible a nitrofurantoína.
- Edad: mayores de 18 años sin tratamientos farmacológicos que interfirieran en las evaluaciones que pretendía este trabajo.
- Libre aceptación mediante consentimiento informado (**Anexo 5**).
- Pacientes que se atendieron en forma ambulatoria en el policlínico de urología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Criterios de Exclusión

- No aceptar firmar el consentimiento informado.
- Menores de 18 años.
- Fumar.
- Tratamientos conjuntos que interfirieran con el tratamiento o enmascararan los efectos sobre el tracto digestivo de tratamiento de la ITU.
- Embarazadas o que estuvieran amamantando o participando en otro estudio clínico.

Distribución de los Pacientes

Pacientes con diagnóstico de infección del tracto urinario bajo, con previa aprobación del consentimiento informado, fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos:

Grupo A: formado por 28 pacientes los cuales recibieron cada 12 horas un comprimido de nitrofurantoína de 100 mg c/u y una cápsula conteniendo el extracto BG126[®], durante 10 días.

Grupo B: formado por 28 pacientes los cuales recibieron cada 12 horas un comprimido de nitrofurantoína de 100 mg c/u y una cápsula conteniendo el excipiente del extracto BG126[®], durante 10 días.

Metodología para el Paciente

Las pacientes seleccionadas tuvieron una entrevista con el Dr. Enrique Ossandón, urólogo tratante del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. En esta entrevista se les informó de la metodología a seguir durante el desarrollo del tratamiento y se les leyó y explicó el consentimiento informado (**Anexo 5**) antes de su firma. Este documento formó parte también del proyecto presentado al Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y su aprobación se adjunta como **ANEXO 6**.

Las pacientes ingresadas al estudio fueron citadas a una entrevista con la Sra. Tamara Torres, enfermera universitaria de la Comisión de Apoyo a la Investigación Clínica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (OAIC). En esta entrevista se les entregó los comprimidos de nitrofurantoína y las cápsulas de extracto BG126[®] o las cápsulas con el excipiente. Las pacientes recibieron

además, un tríptico informativo (**Anexo 7**) y una tabla para el seguimiento de su terapia (**Anexo 8**).

Toma de muestras de sangre y orina

- Luego de la entrevista con la Sra. Tamara Torres, se les tomó una muestra de orina para el análisis de orina completo y una muestra de sangre para evaluar perfil bioquímico, hemograma, FRAP y MDA plasmático.
- Terminado el tratamiento (10 días), los pacientes fueron citados (día 11) a una nueva entrevista con la Sra. Tamara Torres, en la cual se les tomó una segunda muestra de sangre y de orina para controlar la efectividad de su terapia.
- El valor de los rangos normales de los parámetros evaluados en el hemograma y el perfil bioquímico fueron entregados por el Laboratorio

Evaluación de las Reacciones Adversas Medicamentosas (RAM)

Una vez iniciado el tratamiento, se evaluaron las reacciones adversas gastrointestinales más frecuentes: dolor abdominal, dispepsia, náuseas, vómitos, diarrea y el estado general de los pacientes. Esta evaluación se realizó telefónicamente día por medio, desde el día 2 hasta el día 14, que implica un control 4 días después de terminado el tratamiento que sólo fue por 10 días. El motivo de este control fue evaluar las reacciones adversas una vez terminado el tratamiento con nitrofurantoína, se esperaba que al menos ellas disminuyeran en intensidad, dado que la vida media plasmática de este fármaco es alrededor de 20 minutos [33]. Central del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Las reacciones adversas mencionadas fueron catalogadas como leve, moderada o severa de acuerdo a los parámetros siguientes (**Anexo 1**):

Leve: Sin interferencia en actividades cotidianas.

Moderada: Limitación en actividades cotidianas.

Severa: Incapacidad para actividades cotidianas.

Determinación de la capacidad antioxidante plasmática: "FRAP ASSAY"

Esta determinación se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Benzie y Strain, 1996 [34]. Esta técnica mide la reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} , ion que a un pH bajo forma un complejo coloreado con la tripiridiltrazina que absorbe a 593 nm. Los valores obtenidos se comparan con una solución acuosa que contiene iones ferrosos de concentración conocida. Los valores de absorbancia son lineales en un amplio rango de concentración con mezclas de antioxidantes, incluyendo el plasma y soluciones que contienen un antioxidante purificado; es decir, a mayor capacidad antioxidante del plasma, mayor absorbancia a 593 nm.

Determinación de MDA plasmático

Esta determinación se realizó de acuerdo a la técnica HPLC, descrita por Young y Trimble, 1991 [35], utilizando Malondialdehído (MDA) como estándar.

Análisis estadísticos

Para cada parámetro del hemograma, perfil bioquímico y estado redox plasmático, el rango presentado de cada cohorte corresponde al intervalo de confianza del 95% (IC 95%). Las diferencias entre los rangos de estos parámetros se analizaron mediante prueba de Wilcoxon de datos pareados. Esta prueba evalúa las diferencias entre los rangos estudiados, y no las medias aritméticas de los mismos, a diferencia de una prueba clásica t de Student o un ANOVA. Las RAMs

se evaluaron mediante análisis de contingencia de dos colas (prueba de Chi cuadrado). Este análisis evalúa el riesgo relativo de cada cohorte de presentar la RAM. Se consideró como estadísticamente significativa la probabilidad menor al 5% en las pruebas de Wilcoxon y 10% en los estudios de contingencia. Esto último debido a la heterogeneidad de la edad de los pacientes incluidos en este estudio (Figura 2) y al método estadístico utilizado (prueba de Chi cuadrado).

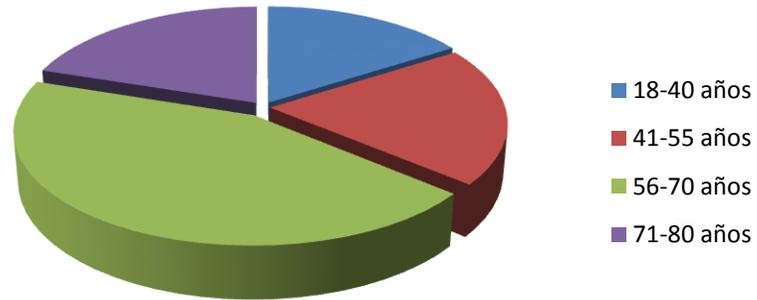
III. RESULTADOS

1. Caracterización del grupo de pacientes

Para realizar este estudio se reclutaron 56 pacientes mujeres de un rango etario que fluctuó entre 18 y 80 años. Todos los pacientes reclutados presentaron urocultivos positivos al inicio de su tratamiento, con sobre 100.000 UFC. *Escherichia coli* correspondió al 94% de todos los patógenos identificados en el urocultivo inicial, mientras que el 6% restante correspondió a otras especies bacterianas, consistente con los patógenos asociados a ITU [36].

Las pacientes reclutadas se distribuyeron en 2 grupos de 28 pacientes cada uno. Un grupo (A) recibió nitrofurantoína (200 mg/día) y placebo y el segundo grupo (B), nitrofurantoína y BG126[®], tratamiento que se aplicó por 10 días. La distribución etaria de los pacientes fue muy similar entre los grupos (**Figura 2**), mostrando que el método de doble ciego randomizado previno la selección arbitraria de pacientes; más del 50% de los pacientes incluidos se encontraban en el intervalo de los 56 a 80 años, lo que coincide con el aumento de incidencias de ITU registradas en mujeres sobre los 55 años de edad [37 -38].

A



B

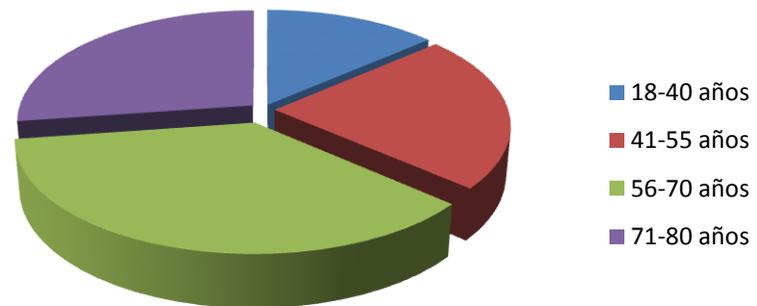


Figura 2. Caracterización etaria de los pacientes incluidos en el estudio. Mujeres cuya edad fluctuó entre los 18 y 80 años. **A:** Pacientes grupo nitrofurantoína más placebo. **B:** Pacientes grupo nitrofurantoína más BG126®

2. Eficacia del tratamiento de nitrofurantoína

Del total de pacientes reclutados (56), 6 pacientes del grupo tratado con nitrofurantoína y 3 del grupo tratado con nitrofurantoína y BG126[®], fueron excluidos del estudio, debido a la aparición de reacciones adversas severas; cada caso fue “re-evaluado” por el equipo clínico. La diferencia en el número de pacientes que sufrieron reacciones adversas gastrointestinales severas sugiere que el extracto BG126[®] puede ser efectivo mitigando la aparición de estas reacciones en el transcurso del tratamiento con nitrofurantoína. Los cuarenta y siete pacientes restantes fueron incluidos en el análisis final, del cual veintidós pacientes recibieron nitrofurantoína y placebo y veinticinco, nitrofurantoína y BG126[®], como se resume en la **Tabla 1**.

Al final del tratamiento, aproximadamente el 19% de los pacientes que recibieron sólo nitrofurantoína presentaron urocultivos positivos y *E. coli* fue identificada como único patógeno en cada una de las muestras. Contrariamente, todos los urocultivos finales de los pacientes que recibieron cápsulas con BG126[®] fueron negativos.

TABLA 1.EFICACIA DEL TRATAMIENTO

| Nitrofurantoína + Placebo | | | |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|--------------------------------------|
| Paciente Reclutados | Pacientes Excluidos | Pacientes Incluidos | *Pacientes con Urocultivos Positivos |
| 28 | 6 | 22 | 4 |
| Nitrofurantoína + BG126® | | | |
| Paciente Reclutados | Pacientes Excluidos | Pacientes Incluidos | *Pacientes con Urocultivos Positivos |
| 28 | 3 | 25 | 0 |

*: Urocultivos positivos una vez terminado el tratamiento.

3. Hemograma y perfil bioquímico

Al inicio y al final de cada tratamiento, se tomaron muestras de sangre a los pacientes para realizar los hemogramas y los perfiles bioquímicos. Estos análisis se realizaron como una forma de evaluar cambios en la homeostasis de los pacientes provocada debido a la nitrofurantoína y/o a la nitrofurantoína y el BG126®. Como se resume en las **Tablas 2 y 3**, el tratamiento con nitrofurantoína, suplementado con placebo o BG126® no produjo cambios estadísticamente significativos en ninguno de los parámetros evaluados, tanto en el hemograma como en el perfil bioquímico. En conjunto, los resultados muestran que la dosis de nitrofurantoína elegida para el tratamiento de la ITU (200mg/día), no provoca toxicidad detectable a nivel de hemograma y perfil bioquímico; más aún se mantuvo la efectividad antimicrobiana de la nitrofurantoína.

4. Capacidad antioxidante

Al inicio y al final del tratamiento, se tomaron muestras de sangre para determinar la capacidad plasmática reductora de Fe^{3+} y la concentración de MDA, producto de oxidación de lípidos, especialmente de membranas celulares. Como se muestra en la **Tabla 4**, ambos parámetros no fueron significativamente alterados en ninguno de los pacientes de ambos grupos en estudio. Luego de la administración de un antioxidante se podría haber esperado un aumento de la actividad antioxidante plasmática. Probablemente, una mayor dosis de BG126[®] (dentro de su margen de seguridad) podría provocar un aumento significativo en la actividad antioxidante plasmática y como consecuencia, una disminución del MDA plasmático.

TABLA 2. PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA

| Parámetro | Rango normal | Nitrofurantoína + Placebo | | | Nitrofurantoína + BG126® | | |
|--|--------------|---------------------------|-------------|----------|--------------------------|-------------|---------------|
| | | Inicial | Final | <i>p</i> | Inicial | Final | <i>P</i> |
| Eritrocitos (10 ⁶ /mm ³) | 4,5 – 4,9 | 4,5 – 4,8 | 4,5 – 4,8 | 0,9031 | 4,4 – 4,7 | 4,4 – 4,7 | 0,8401 |
| Hematocrito (%) | 37,0 – 47,0 | 38,7 – 41,4 | 39,0 – 42,1 | 0,1764 | 38,3 – 41,8 | 38,1 – 41,7 | 0,9571 |
| Hemoglobina (fL) | 12,0 – 16,0 | 13,3 – 14,4 | 13,1 – 14,9 | 0,9482 | 13,0 – 14,8 | 12,3 – 14,7 | 0,5023 |
| VCM (fL) | 82,0 – 95,0 | 84,7 – 89,3 | 84,2 – 88,3 | 0,2838 | 82,3 – 91,9 | 82,5 – 91,8 | 0,4920 |
| HCM (pg) | 27,0 – 31,0 | 28,5 – 30,1 | 27,0 – 30,6 | 0,8454 | 28,9 – 30,6 | 28,8 – 30,5 | 0,8195 |
| CHCM (g/dL) | 32,0 – 36,0 | 33,7 – 34,6 | 30,9 – 35,1 | 0,4040 | 33,5 – 34,3 | 33,3 – 35,2 | 0,8195 |
| VHS (mm/h) | 0 – 30,0 | 23,0 – 46,0 | 25,0 – 47,0 | 0,5891 | 27,0 – 47,0 | 24,0 – 45,0 | 0,3133 |
| Leucocitos (μL ⁻¹) | 4000 – 10000 | 6360 – 7869 | 5845 – 7579 | 0,1441 | 6667 – 7743 | 6387 – 7933 | 0,8400 |
| Monocitos (μL ⁻¹) | --- | 354 – 510 | 314 – 422 | 0,0597 | 354 – 481 | 364 – 495 | 0,9143 |
| Linfocitos (μL ⁻¹) | --- | 1761 – 2343 | 1694 – 2324 | 0,8456 | 2029 – 2529 | 2032 – 2671 | 0,4042 |
| Neutrófilos (μL ⁻¹) | --- | 3807 – 5022 | 3419 – 4757 | 0,8202 | 3889 – 4710 | 3542 – 4757 | 0,8086 |
| Eosinófilos (μL ⁻¹) | --- | 116 – 214 | 109 – 325 | 0,0691 | 136 – 232 | 134 – 259 | 0,7861 |
| Plaquetas (10 ³ /μL) | 150 – 400 | 252 – 332 | 248 – 328 | 0,6513 | 253 – 330 | 243 – 315 | 0,2364 |

VCM: significa Volumen Corpuscular Medio, HCM: significa hemoglobina corpuscular media, CHCM: significa concentración de hemoglobina corpuscular media, Velocidad de Hemosedimentación. Los rangos en cada grupo corresponden a un 95% de Intervalo de confianza. El valor *p* fue obtenido a través de test pareado de Wilcoxon.

TABLA 3. PARÁMETROS DEL PERFIL BIOQUÍMICO

| Parámetro | Rango normal | Nitrofurantoína + Placebo | | | Nitrofurantoína + BG126 [®] | | |
|--------------------------------|--------------|---------------------------|-------------|----------|--------------------------------------|-------------|---------------|
| | | Inicial | Final | <i>p</i> | Inicial | Final | <i>p</i> |
| Glucosa (mg/dL) | 75 ,0– 100 | 68,8 – 118 | 81,0 – 130 | 0,0948 | 85,5 – 135 | 87,5 – 118 | 0,6156 |
| Colesterol (mg/dL) | < 200 | 174 – 206 | 176 – 211 | 0,4978 | 186 – 226 | 184 – 226 | 0,8715 |
| Bilirrubina (mg/dL) | 0,2 – 1,3 | 0,4 – 0,7 | 0,5 – 0,7 | 0,2300 | 0,4 – 0,6 | 0,4 – 0,6 | 0,8483 |
| Ácido Úrico (mg/dL) | 2,5 – 7,5 | 3,8 – 4,8 | 3,4 – 4,4 | 0,9482 | 3,8 – 4,8 | 3,8 – 4,6 | 0,5023 |
| NUS (mg/dL) | 7,0 – 17,0 | 12,0 – 17,0 | 13,0 – 16,0 | 0,6984 | 13,0 – 18,0 | 14,0 – 17,0 | 0,3969 |
| Calcio (mg/dL) | 8,40 – 10,2 | 9,03 – 9,61 | 9,02 – 9,53 | 0,8615 | 9,14 – 9,42 | 9,06 – 9,31 | 0,0746 |
| Fosforo (mg/dL) | 2,5 – 4,5 | 3,6 – 4,2 | 3,6 – 4,0 | 0,5753 | 3,6 – 4,2 | 3,6 – 4,1 | 0,9886 |
| Proteínas Totales (g/dL) | 6,3 – 8,2 | 7,0 – 7,5 | 7,2 – 7,3 | 0,0855 | 7,1 – 7,6 | 7,3 – 7,8 | 0,1771 |
| Albumina (g/dL) | 3,5 – 5,0 | 4,1 – 4,5 | 4,1 – 4,4 | 0,6252 | 4,0 – 4,4 | 4,1 – 4,5 | 0,5655 |
| GOT (UI/L) | 14,0 – 36,0 | 23,0 – 33,0 | 23,0 – 31,0 | 0,4438 | 23,0 – 35,0 | 25,0 – 36,0 | 0,4272 |
| FA (UI/L) | 38,0 – 126 | 79,4 – 108 | 83,4 – 111 | 0,1724 | 96,8 – 118 | 96,9 – 119 | 0,1561 |
| LDH (UI/L) | 313 – 618 | 473 – 546 | 471 – 561 | 0,8202 | 479 – 569 | 492 – 591 | 0,8086 |

FA: Fosfatasa Alcalina, NUS: Nitrógeno Úreico Sanguíneo, GOT: Transaminasa Oxalacética, UI: Unidad Internacional, LDH: Lactato Deshidrogenasa. Los rangos en cada grupo corresponden a un 95% de Intervalo de confianza. El valor *p* fue obtenido a través de test pareado de Wilcoxon.

TABLA 4. ESTADO REDOX PLASMÁTICO

| Parámetro | Nitrofurantoína + Placebo | | | Nitrofurantoína + BG126 [®] | | |
|--------------------|---------------------------|-------------|----------|--------------------------------------|-------------|----------|
| | Inicial | Final | <i>p</i> | Inicial | Final | <i>P</i> |
| MDA (μ M) | 0,39 – 0,62 | 0,44 – 0,68 | 0,2989 | 0,54 – 0,78 | 0,49 – 0,72 | 0,4352 |
| FRAP (μ M) | 253 – 299 | 227 – 278 | 0,0914 | 253 – 298 | 264 – 307 | 0,6668 |

MDA: Malondialdehído; FRAP: Capacidad reductora de hierro. Rangos para cada grupo corresponden al 95% Intervalo de Confianza. El valor *p* se obtuvo mediante el test pareado de Wilcoxon.

5. Aparición y severidad de las reacciones adversas gastrointestinales asociadas a la administración oral de nitrofurantoína

Durante el tratamiento, los pacientes fueron encuestados cada dos días. Con el objeto de verificar la persistencia de reacciones adversas gastrointestinales a la nitrofurantoína, se realizó una encuesta adicional cuatro días después de terminado el tratamiento. Cabe destacar que la vida media de la nitrofurantoína es de alrededor de 20 minutos [33], por lo tanto, reacciones adversas después de 4 días terminado el tratamiento, no deberían corresponder a la administración de este fármaco.

Las encuestas fueron diseñadas para evaluar la aparición y persistencia de las reacciones adversas gastrointestinales de acuerdo a lo descrito en Metodologías (**Anexo 1**) Cabe destacar que los pacientes que sufrieron reacciones adversas gastrointestinales en la graduación severa fueron eliminados del estudio y re-evaluados por el equipo médico que supervisó el cuidado de las pacientes. Así, los resultados de las encuestas incluyen reacciones adversas en los grados siguientes: ausente, leve y moderada.

Dolor Abdominal. El número pacientes/día que presentó dolor abdominal y la severidad de este efecto adverso fueron mayores en el grupo que recibió nitrofurantoína y placebo en comparación con el que recibió nitrofurantoína y BG126®. Así, las pacientes del grupo que recibió nitrofurantoína y BG126® presentaron dolor abdominal en el grado solamente leve, efecto que se mantuvo durante los 10 días de tratamiento y desapareció totalmente el día 14 (4 días después de finalizado el tratamiento). Cabe destacar que el dolor abdominal persistió hasta cuatro días después de finalizado el tratamiento en el grupo de pacientes que recibió nitrofurantoína y placebo (día 14) (**Figura 3 y Tabla 5**).

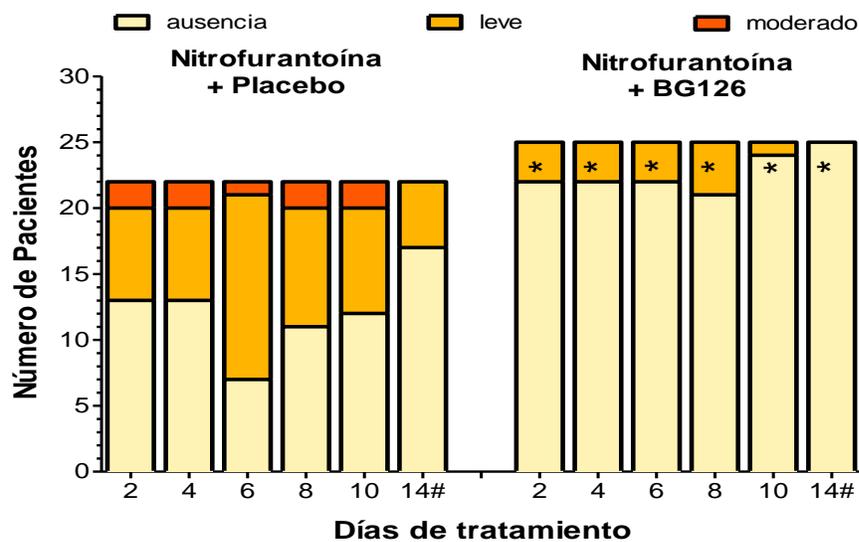


Figura 3. Presencia de dolor abdominal en pacientes tratados con nitrofurantoína asociada a placebo o BG126®.

El valor p fue obtenido mediante el test de Chi cuadrado comparando los resultados de cada día por separado de ambos grupos de pacientes. *: $p < 0,1$. 14#: corresponde a la evaluación de náusea 4 días después de terminado el tratamiento (10 días).

TABLA 5. ANÁLISIS DE CONTINGENCIA: DOLOR ABDOMINAL

| Días de tratamiento | Nitrofurantoína + Placebo | | | Nitrofurantoína + BG126® | | | <i>p</i> |
|------------------------|---------------------------|----|----|--------------------------|---|----|--------------------|
| | A | L | Mo | A | L | Mo | |
| 2 | 13 | 7 | 2 | 22 | 3 | 0 | 0,023* |
| 4 | 13 | 7 | 2 | 22 | 3 | 0 | 0,023* |
| 6 | 7 | 14 | 1 | 22 | 3 | 0 | <0,0001* |
| 8 | 11 | 9 | 2 | 21 | 4 | 0 | 0,013* |
| 10 | 12 | 8 | 2 | 24 | 1 | 0 | 0,008* |
| 14 [#] | 17 | 5 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0,0012* |

(A): ausencia de dolor abdominal; (L): presencia de dolor abdominal en grado leve; (Mo): presencia de dolor abdominal grado moderado. El valor *p* fue obtenido mediante el test de Chi cuadrado. **p*<0,1 14[#] corresponde a 4 días después de terminado el tratamiento (10 días).

Nausea. La aparición de este efecto adverso siguió un patrón similar a la aparición del dolor abdominal (**Figura 3 y Tabla 5**). El grupo que recibió nitrofurantoína y placebo exhibió un número mayor de pacientes/día afectados con este efecto adverso y una mayor severidad del mismo. A diferencia de las pacientes que recibieron nitrofurantoína y placebo, las pacientes del grupo que recibió BG126® presentaron nausea en el grado moderado hasta el 4° día de tratamiento; este efecto cambió a grado leve al 4° día y desapareció totalmente el día 14 (4 días después de finalizado el tratamiento). Cabe destacar que la nausea persistió en el grupo de nitrofurantoína y placebo durante los días de tratamiento (día 10) y cuatro días después de finalizado (día 14). (**Figura 4 y Tabla 6**).

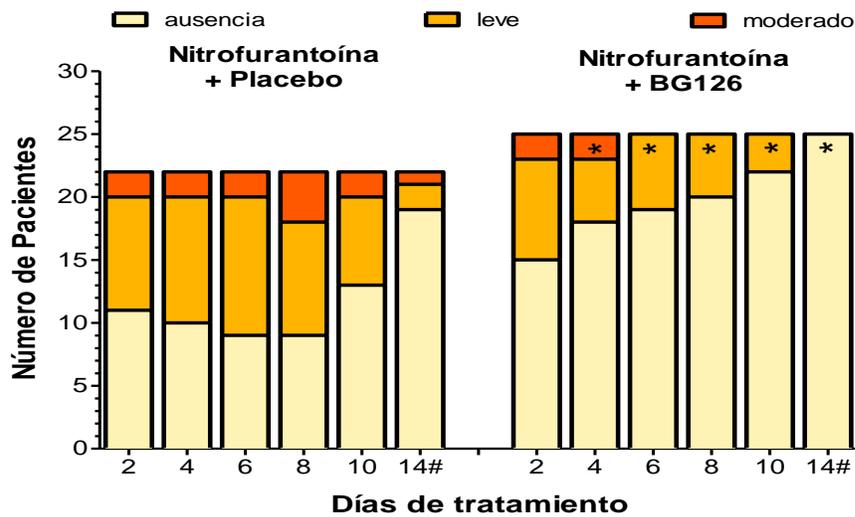


Figura 4. Presencia de náusea en pacientes tratados con nitrofurantoina asociada a placebo o BG126[®]. El valor p fue obtenido mediante el test de Chi cuadrado comparando los resultados de cada día por separado de ambos grupos de pacientes. *: $p < 0,1$. 14#: corresponde a la evaluación de náusea 4 días después de terminado el tratamiento (10 días).

TABLA 6. ANÁLISIS DE CONTINGENCIA: NAUSEA

| Días de tratamiento | Nitrofurantoina + Placebo | | | Nitrofurantoina + BG126 [®] | | | p |
|---------------------|---------------------------|----|----|--------------------------------------|---|----|----------------|
| | A | L | Mo | A | L | Mo | |
| 2 | 11 | 9 | 2 | 15 | 8 | 2 | 0,49 |
| 4 | 10 | 10 | 2 | 18 | 5 | 2 | 0,064* |
| 6 | 9 | 11 | 2 | 19 | 6 | 0 | 0,014* |
| 8 | 9 | 9 | 4 | 20 | 5 | 0 | 0,0059* |
| 10 | 13 | 7 | 2 | 22 | 3 | 0 | 0,023* |
| 14 [#] | 19 | 2 | 1 | 25 | 0 | 0 | 0,056* |

(A): ausencia de náusea; (L): presencia de náusea en grado leve; (Mo): presencia de náusea grado moderado. El valor p fue obtenido mediante el test de Chi cuadrado. * $p < 0,1$ 14[#] corresponde a 4 días después de terminado el tratamiento (10 días).

Diarrea. Los pacientes que recibieron nitrofurantoína y BG126[®] no presentaron diarrea durante el tratamiento. En contraste, los pacientes que recibieron nitrofurantoína y placebo exhibieron diarrea desde el día 8 hasta el día 14 que correspondió al último día que se realizó la encuesta (**Figura 5 y Tabla 7**)

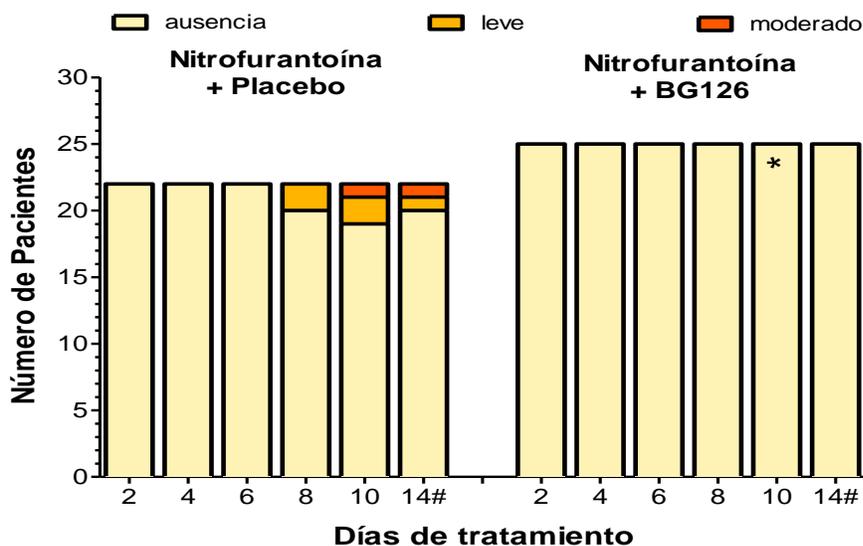


Figura 5. Presencia de diarrea en pacientes tratados con nitrofurantoína asociada a placebo o BG126[®]. El valor p fue obtenido mediante el test de Chi cuadrado comparando los resultados de cada día por separado de ambos grupos de pacientes. *: $p < 0,1$. 14#: corresponde a la evaluación de náusea 4 días después de terminado el tratamiento (10 días).

TABLA 7
ANÁLISIS DE CONTINGENCIA: DIARREA

| Días de tratamiento | Nitrofurantoína + Placebo | | | Nitrofurantoína + BG126 [®] | | | <i>p</i> |
|------------------------|---------------------------|---|----|--------------------------------------|---|----|-----------------|
| | A | L | Mo | A | L | Mo | |
| 2 | 22 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | >0,05 |
| 4 | 22 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | >0,05 |
| 6 | 22 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | >0,05 |
| 8 | 20 | 2 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0,12 |
| 10 | 19 | 2 | 1 | 25 | 0 | 0 | 0,056* |
| 14 [#] | 20 | 1 | 1 | 25 | 0 | 0 | 0,12 |

(A): ausencia de diarrea; (L): presencia de diarrea en grado leve; (Mo): presencia de diarrea grado moderado. El valor p fue obtenido mediante el test de Chi cuadrado.
*p<0,1 14# corresponde a 4 días después de terminado el tratamiento (10 días).

IV. DISCUSIÓN

Muchos medicamentos producen efectos adversos que de acuerdo al grado de severidad, pueden determinar que el paciente abandone el tratamiento. Los mecanismos involucrados en la presencia e intensidad de las reacciones adversas a medicamentos son diversos. Uno de los mecanismos principales se relaciona con la capacidad metabólica de los pacientes. Al respecto y como se mencionó en la introducción, se ha propuesto que las reacciones adversas provocadas por la administración oral de nitrofurantoína, están asociadas a la nitroreducción de este fármaco, proceso metabólico que induciría estrés oxidativo. Si se acepta este postulado, la administración de un preparado natural con propiedades antioxidantes, podría atenuar los efectos adversos gastrointestinales producidos por la ingesta oral del tratamiento de nitrofurantoína. Efectivamente, la suplementación del tratamiento de nitrofurantoína (200mg/día) con BG126[®] en el transcurso de un tratamiento de 10 días, mitigó las reacciones adversas gastrointestinales de los pacientes, entre ellas náusea, dolor abdominal y diarrea (**Figuras 3, 4 y 5**). Más aún, los datos obtenidos en este estudio clínico indican que esta asociación de medicamentos potencia la actividad antimicrobiana de la nitrofurantoína, sin mostrar ningún efecto dañino a nivel de hemograma, perfil bioquímico y capacidad antioxidante plasmática (**Tablas 2, 3 y 4**).

La náusea, el dolor abdominal y la diarrea son efectos asociados a procesos inflamatorios gastrointestinales. En cambio, la dispepsia y el vómito muestran etiologías de diversa naturaleza, cuyos orígenes pueden ser o no, parte de un proceso inflamatorio del tracto gastrointestinal. Estas observaciones son consistentes tanto con la actividad antioxidante y antiinflamatoria que se le atribuye a los extractos de las hojas de matico, droga vegetal utilizada para preparar BG126[®] [39-41]. Considerando estos antecedentes y los resultados

obtenidos, se puede inferir que los efectos benéficos provocados por BG126[®] se deberían a un efecto local de este preparado sobre la pared gastrointestinal. Cabe destacar que BG126[®] asociado a nitrofurantoína no aumentó la capacidad antioxidante plasmática, lo cual podría reflejar una baja absorción de los principios activos antioxidantes. Entre estos compuestos se encuentran algunos flavonoides de reconocida actividad antiinflamatoria [27]. En resumen, el tratamiento con BG126[®] mostró ser un fitofármaco seguro y eficaz. Además, su uso no alteró la actividad antimicrobiana de la nitrofurantoína, al contrario, la potenció (**Tabla 1**).

La nitrofurantoína es un antimicrobiano con un amplio espectro de acción. Es el fármaco de primera opción para el tratamiento de las ITU, ya que presenta bajos niveles de resistencia y una gran amplitud de espectro antibacteriano. Más aún, la resistencia a la nitrofurantoína de diferentes bacterias que invaden el tracto urinario, especialmente la *Escherichia coli* no ha aumentado en Chile, en los últimos 10 años (datos no publicados). Estas características sin embargo, se ven opacadas por el alto porcentaje de reacciones adversas que provoca su administración oral. De aquí la importancia de este estudio: la terapia asociada demostró mejorar el tratamiento de las infecciones del tracto urinario, patología de alta incidencia en la población chilena y mundial, mejorando así la calidad de vida de los pacientes. Nuevos experimentos están en proceso para dilucidar los mecanismos a través de los cuales BG126[®] potencia la actividad antibacteriana de nitrofurantoína.

CONCLUSIONES

- BG126[®] co-administrado junto a la nitrofurantoína, en una terapia de 10 días (200mg/día), demostró disminuir el dolor abdominal, náusea y diarrea, efectos adversos gastrointestinales asociados a la administración de este fármaco.
- El grupo de pacientes que recibió nitrofurantoína asociada a BG126[®] no presentó urocultivos positivos una vez terminado el tratamiento; sin embargo, un 19% de los pacientes del grupo que recibió sólo nitrofurantoína mostro urocultivo positivo al final del tratamiento.
- La administración de BG126[®] asociado al tratamiento de nitrofurantoína podría mejorar la calidad de vida de los pacientes, ya que disminuye la aparición de reacciones adversas y mejora la adherencia de ellos a la terapia.

V. REFERENCIAS

- [1] Cortés M, Salazar A, Acuña J, Armijo G, Orellana N, López de Santa María J, Berner R, Estrugo A, Riffo C, Moraga V (2007). Cambios en la sensibilidad antibiótica de *E. coli* en mujeres con infección urinaria baja ambulatoria en un período de 10 años. *Revista Chilena de Urología*. 72: 289–291.
- [2] Azanza JR, Sadaba D, Mediavilla A (1997). In: Flórez J. (Editor). *Farmacología Humana*. 3ª Edición. Masson S.A. Barcelona, España.
- [3] McOsker CC, Fitzpatrick PM (1994). Nitrofurantoin: mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 33 Suppl A: 23-30.
- [4] Cortes M, Salazar A, Acuña J (2007). Change in *E.Coli* antibiotic therapy resistance in female urinary tract infections in the last 10 years: *Revista Chilena de Urología*. 72(3): 289-291.
- [5] Witten CM (1989). Pulmonary toxicity of nitrofurantoin. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 70: 55-57.
- [6] Paiva LA, Wright PJ, Koff RS (1992). Long-term hepatic memory for hypersensitivity to nitrofurantoin. *American Journal of Gastroenterology*. 87: 891-893.
- [7] Jackowitz AI, Le Frock JL, Prince R A (1977). Nitrofurantoin polyneuropathy: report of two cases. *American Journal of Hospital Pharmacy*. 34: 759-762.
- [8] Gait JE (1990). Hemolytic reactions to nitrofurantoin in patients with glucose-6- phosphate dehydrogenase deficiency: theory and practice. *The Annals of Pharmacotherapy*. 24: 1210-1213.

- [9] Martin WJ 2nd (1983). Nitrofurantoin: evidence for the oxidant injury of lung parenchymal cells. *The American Review of Respiratory Diseases*. 127: 482-486.
- [10] Rossi L, Silva JM, McGirr LG, O'Brien PJ (1988). Nitrofurantoin-mediated oxidative stress cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*. 37: 3109-3117.
- [11] Olea-Azar C, Rigol C, Mendizabal F, Morello A, Maya JD, Mondaca C, Cabrera E, Di Maio R, González M, Cerecetto H (2003). ESR spin trapping studies of free radicals generated from nitrofurantoin derivative analogues of nifurtimox by electrochemical and *Trypanosoma cruzi* reduction. *Free Radical Research*. 37: 993–1001.
- [12] Miller C (2002). Revisiting the interaction of the radical anion metabolite of nitrofurantoin with glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 397: 113–118.
- [13] Minchin RF, Ho PC, Boyd MR (1986). Reductive metabolism of nitrofurantoin by rat lung and liver in vitro. *Biochemical Pharmacology*. 35: 575-580;
- [14] Letelier ME, Izquierdo P, Godoy L, Lepe AM, Faúndez MJ (2004). Liver microsomal biotransformation of nitro-aryl drugs: mechanism for potential oxidative stress induction. *Journal of Applied Toxicology*. 24(6): 519-525.
- [15] Neuzil J, Gebicki JM, Stocker R (1993). Radical-induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *The Biochemical Journal*. 293 (Pt 3): 601-606.
- [16] Pourahmad J, Khan S, O'Brien PJ (2001). Lysosomal oxidative stress cytotoxicity induced by nitrofurantoin redox cycling in hepatocytes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 500: 261-265.

- [17] Lemaire P, Livingstone DR (1994). Inhibition studies on the involvement of flavoprotein reductases in menadione- and nitrofurantoin-stimulated oxyradical production by hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*). *Journal of Biochemical Toxicology*. 9: 87-95.
- [18] Sreider CM, Grinblat L, Stoppani AO (1990). Catalysis of nitrofurantoin redox-cycling and superoxide anion production by heart lipoamide dehydrogenase. *Biochemical Pharmacology*. 40: 1849-1857;
- [19] Pechère J, Hughes D, Kardas P, Cornaglia G. (2007). Non-compliance with antibiotic therapy for acute community infections: a global survey. *International Journal of Antimicrobial Agents* 29: 245-253.
- [20] Jovanovic SV, Steenken S, Simic MG, Hara Y. (1998) Antioxidant properties of flavonoids: reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals. En: Rice Evans C, Parker L (eds.): *Flavonoids in health and disease*. Marcel Dekker, Nueva York, pp. 137-161.
- [21] Aw TY (2005). Intestinal glutathione: determinant of mucosal peroxide transport, metabolism, and oxidative susceptibility. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204: 320-328.
- [22] Ruel G, Pomerleau S, Couture P, Lamarche B, Couillard C (2005). Changes in plasma antioxidant capacity and oxidized low-density lipoprotein levels in men after short-term cranberry juice consumption. *Metabolism Clinical and Experimental*. 54: 856-861.
- [23] Mellado V, Medina E, San Martín C (1996). *Herbolaria Médica de Chile: Diagnóstico de su estado actual y perspectivas futuras para la Medicina Oficial Chilena*. Ministerio de Salud, Santiago de Chile.

- [24] Doll U, Vogel H, Jeldres P, Muñoz M (2003). Estudios de propagación vegetativa en Matico (*Buddleja globosa*). Ciencia e Investigación Agraria: Revista Latinoamericana de Ciencias de la Agricultura. 30: 211-216.
- [25] Hoffmann A, Farga MC, Lastra J, Veghazi E (1992). Plantas medicinales de uso común en Chile. Segunda edición. Ediciones Fundación Claudio Gay. Santiago. Chile.
- [26] Houghton PJ, Hylands PJ, Mensah AY, Hensel A, Deters AM (2005). In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. Journal of Ethnopharmacology. 100: 100-107.
- [27] Backhouse N, Rosales L, Apablaza C, Goity L, Erazo S, Negrete R, Theodoluz C, Rodríguez J, Delporte C (2008). Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. Journal of Ethnopharmacology. 116: 263–269.
- [28] Letelier ME, Jones R, Lopez C, Palma K, Aracena P, Razmilic I, Polanco X, Vogel H (2012) Safety profile and wound healing properties of a standardized *Buddleja globosa* Hope (Matico) extract in Sprague-Dawley rats. Revista de Farmacología de Chile. 5(2):13-19.
- [29] Houghton P (1984). Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. Journal of Ethnopharmacology. 11: 293-308.
- [30] Mensah A, Houghton P, Hughes M (1998). In vitro investigation of the wound-healing properties of *Buddleja globosa*. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 50: 83.
- [31] Houghton P, Mensah A (1999). Biologically-active compounds from *Buddleja* species. Phytochemicals New York: Kluwer Academic/Plenum. 33:343-68.

- [32] Vargas L. (2001). Evaluación de las actividades analgésica y antiinflamatoria de *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. Formulación de un preparado dermatológico. Santiago de Chile: Tesis; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- [33] Hammam E (2002). Determination of nitrofurantoin drug in pharmaceutical formulation and biological fluids by square-wave cathodic absorptive stripping voltammetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 30: 651-659.
- [34] Benzie IFF, Strain JJ (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76.
- [35] Young IS, Trimble ER (1991). Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Annals of Clinical Biochemistry*. 28: 504- 508.
- [36] Guay DRP (2008). Contemporary management of uncomplicated urinary tract infections. *Drugs*. 68: 1169–1205.
- [37] Richards CL (2004). Urinary tract infections in the frail elderly: issues for diagnosis, treatment and prevention. *International Urology and Nephrology*. 36: 457–463.
- [38] Valdevenito JP (2008). Recurrent urinary tract infection in women. *Revista Chilena de Infectología*. 25: 268–276.
- [39] Vogel H, Jeldres P, Razmilic I, Doll U (2011). Morphological characters, yields and active principles in wild and cultivated accessions of the Chilean medicinal plant *Buddleja globosa* Hope. *Industrial Crops and Products*. 34: 1322-1326.

- [40] Vogel H, Razmilic I, Polanco X, Letelier ME (2010). Effect of different provenances and production conditions on antioxidant properties in *Buddleja globosa* leaves. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 9:333–342.
- [41] Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T (2001). Plantas medicinales de uso en Chile, Química y Farmacología. Santiago de Chile: Editorial Universitaria. 22: 69-72.

ANEXO 1

FORMULARIO DE ATENCIÓN FARMACÉUTICA ESTUDIO CLÍNICO MATICO-NITROFURANTOÍNA

Nombre paciente: _____

Teléfono: _____

Fecha inicio tratamiento: _____

| RAM | Día 2 | Día 4 | Día 6 | Día 8 | Día 10 | Día 14 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|
| frecuentes | | | | | | |
| Dolor abdominal | | | | | | |
| Dispepsia | | | | | | |
| Nauseas | | | | | | |
| Vómitos | | | | | | |
| Diarrea | | | | | | |
| Prurito/Rash | | | | | | |

Leyenda: No (ausencia); Leve (no interfiere con actividades cotidianas); Moderado (limita actividades cotidianas); Severo (impide actividades cotidianas).

| RAM de riesgo* | Día 2 | Día 4 | Día 6 | Día 8 | Día 10 | Día 14 |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Dificultad respiratoria | | | | | | |
| Fiebre | | | | | | |
| Tos inexplicada | | | | | | |

*** Su aparición conduce a la suspensión del tratamiento.**

ANEXO 2

Table 1. Characterization of the matico extract

| <i>Botanical Characteristics</i> | |
|--|---|
| Species | <i>Buddleja globosa</i> |
| Vegetable drug | Leaves |
| <i>Organoleptic Properties</i> | |
| Appearance | Liquid |
| Color | Dark brown |
| <i>Physicochemical Properties</i> | |
| pH | 5.2 |
| Alcohol degree (at 15°C) | 59° GL |
| Solid residues | 4,5% |
| <i>Chemical Identification</i> | |
| Flavonoids | Positive |
| Tannins | Positive |
| Saponins | Positive |
| Reducing sugars | Positive |
| Total polyphenol content | 30.6 ± 2.36 nmol-equivalents catechin/μL |

ANEXO 3

UNIVERSIDAD DE CHILE
HOSPITAL CLÍNICO
Comité Ético



ACTA DE APROBACION N° 03

SANTIAGO : 09 ENE. 2008

PROYECTO : "Estrés oxidativo inducido por bioactivación de nitrofurantoinas y sus efectos adversos : Efectos de un preparado estandarizado de Buddeja globosa hope (MATICO) como antioxidante".

INVESTIGADOR RESPONSABLE : Dra. María Eugenia Letelier

INSTITUCION : Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de Chile

El proyecto ha sido analizado por el Comité Ético Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, a la luz de los postulados nacionales e internacionales que regulan la investigación Biomédica, que involucran a seres humanos.

En base a la información proporcionada en el texto del proyecto, este Comité opina, que el estudio propuesto está justificado y que para los sujetos involucrados no implica más riesgos que mínimos.

Asimismo, se analizó y aprobó el consentimiento informado. Versión de fecha 12 de Diciembre de 2007.

Hechas las correcciones sugeridas al consentimiento informado el Comité otorga aprobación ética del protocolo propuesto.

Saluda atentamente a usted,

DR. GUILLERMO PIWONKA C.
PRESIDENTE COMITÉ DE ETICA

Distribución
- Archivo

ANEXO 4

UNIVERSIDAD DE CHILE
HOSPITAL CLINICO
Comité Ética



MEMO N° : 098

MAT. : Recepción Documento

SANTIAGO : 20 de Julio de 2009

Señora
Dra. María Eugenia Letelier
Investigadora Principal
Departamento de Farmacología y Toxicología
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Universidad de Chile
Presente

Estimada Dra. Letelier :

En el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile hemos recibido solicitud de extensión por 2do año del proyecto denominado "MITIGACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS DE NITROFURANTOÍNA UTILIZANDO UN EXTRACTO SECO ESTANDARIZADO DE BUDDLEJA GLOBOSA HOPE (MATICO), el cual se encuentra en proceso de revisión por el citado Comité.

Este protocolo fue aprobado por el este Comité de Ética en Acta de Aprobación N° 03 de fecha 09 de Enero del 2008.

Se extiende el presente certificado para ser presentado en CONICYT.

Saluda atentamente a Usted.



DR. GUILLERMO FIWONKA
PRESIDENTE COMITÉ DE ETICA

Distribución

- Dra. Paula Aracena Stiven, Co-autora.
- Archivo
- 15/07/2009

ANEXO 5

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACION CLINICA

NOMBRE DEL PROYECTO:

MITIGACIÓN DE EFECTOS ADVERSOS DE NITROFURANTOÍNA UTILIZANDO UN EXTRACTO SECO ESTANDARIZADO DE *Buddleja globosa* Hope (MATICO).

INVESTIGADORA RESPONSABLE: Prof. María Eugenia Letelier Muñoz. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

CO-INVESTIGADORA: Dra. Paula Aracena Stiven. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile

INVESTIGADOR ALTERNO: Dr. Enrique Ossandón Salas. Servicio de Urología. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Se me ha solicitado participar en un proyecto de investigación que estudiará la utilidad del extracto de la planta medicinal Matico (*Buddleja globosa* Hope) en la prevención de la intolerancia a nitrofurantoína, fármaco utilizado para el tratamiento de infecciones urinarias. Este estudio podría ser de gran ayuda en el futuro para pacientes que sufren Infección del Tracto Urinario Bajo y que son tratados con nitrofurantoína. Este proyecto cuenta con la aprobación del Comité Ético Científico del Hospital Clínico Universidad de Chile, presidido por el Dr. Guillermo Piwonka Corral. Este comité funciona en el Hospital Clínico Universidad de Chile, en el Sector O Oficina N° 04 -197, teléfono: 9789008, donde Ud. podrá encontrar satisfacción a sus dudas respecto de su participación en este estudio.

Yo entiendo que:

1. La infección del tracto urinario que padezco será tratada con el fármaco nitrofurantoína (genérico) en dos dosis diarias de 100 mg c/u. Este tratamiento se extenderá por un período de 10 días.
2. Como éste es un estudio aleatorio de investigación, la mitad de los pacientes incluidos en este estudio recibirán, además, cápsulas de matico, producto natural que no tiene riesgos para la salud; a la otra mitad, se les remplazará las cápsulas de matico por cápsulas de placebo, que no poseen la actividad terapéutica atribuida al matico y que tampoco tienen riesgos para la salud.
3. Me extraerán sangre (5 mL) antes de iniciar el tratamiento con nitrofurantoína y al final de éste (10 días). En estas muestras se analizará hemograma y perfil bioquímico.
4. Estoy consciente que la extracción de sangre me puede provocar una molestia y además, que la obtención de ella, no interfiere en nada con los otros análisis que requiere mi médico tratante.
5. Asimismo, me tomarán muestras de orina para los análisis de orina completa y urocultivo para el diagnóstico y control de mi infección urinaria, antes de iniciar el tratamiento y al final de éste (10 días).
6. Yo no tendré beneficios económicos con este estudio, a excepción de los medicamentos y exámenes que no tendrán costo alguno para mí.
7. Yo podré retirarme de este estudio en cualquier momento, sin ser obligada a dar razones y sin que esto me perjudique en mi calidad de paciente o usuaria del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
8. Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelado, y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad sea solicitada por ley.

9. Cualquier pregunta que yo quiera hacer con relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por el Dr. Enrique Ossandón Salas (Médico tratante), por la Prof. María Eugenia Letelier Muñoz (Investigadora responsable del Proyecto) o por la Dra. Paula Aracena Stiven (Co-investigadora del Proyecto)
10. Mi consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzada u obligada.

Teléfonos de Contacto

- Dr. Enrique Ossandón. Servicio de Urología Hospital Clínico Universidad de Chile: 777 8758.
- Prof. María Eugenia Letelier (Investigadora Responsable del Proyecto): 9-4199035 (celular); 9782885 (oficina).
- Dra. Paula Aracena Stiven (Co-investigadora del Proyecto): 9-5507905 (celular); 9782885 (oficina).

FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL
O MEDICO RESPONSABLE

FIRMA DEL PACIENTE O
REPRESENTANTE LEGAL

NOMBRE: NOMBRE.....

FIRMA MINISTRO DE FÉ

NOMBRE:

FECHA

ANEXO 6

UNIVERSIDAD DE CHILE
HOSPITAL CLINICO
Comité Ética



MEMO N° : 198
MAT. : Aprobación C.I.
SANTIAGO : 26 NOV. 2009

Señora
Dra. María Eugenia Letelier
Investigador Principal
Departamento Farmacología
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad de Chile
Santiago

Estimada Dra. Letelier :

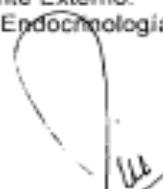
De acuerdo a su solicitud en relación a cambios realizados en el Consentimiento Informado del protocolo denominado "Mitigación de efectos adversos de Nitrofurantoina utilizando un extracto seco estandarizado de Buddleja Globosa Hope (MATICO)", estos se aprueban.

Se aclara que se trata del Comité Ético Científico del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, quien analiza los protocolos de investigación biomédica que se ejecutan en este Hospital Clínico U. de Chile.

El Comité funciona en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, en el Sector D Oficina N° D4 - 197, teléfono : 9789008, donde los probando podrán encontrar satisfacción a sus dudas respecto de participación del protocolo. El Comité está integrado por:

Dr. Guillermo Piwonka C. Médico Cirujano Cardiovascular. Presidente
Dra. Ana María Madrid S., Médico Gastroenterólogo. Secretaria
Dr. Sergio Valenzuela P., Médico Ginecoobstetra
Dr. Javier Brahm B., Médico Gastroenterólogo
Dr. Héctor Gatica R., Médico Reumatólogo
Dr. Lautaro Osorio F., Médico Nefrólogo. Integrante Externo.
B.Q. Carmen Romero O., Bioquímica Especialidad Endocrinología
Dr. Juan Carlos Prieto D., Farmacología Clínica
Srta. Rina Sepúlveda A., Abogado.

Saluda atentamente,


DR. GUILLERMO PIWONKA CORRAL
PRESIDENTE COMITÉ DE ETICA

-Dra. Paula Aracena. Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas U. de Chile.
Archivo.
26/11/2009

ANEXO 7

Recuerde que es necesario que usted acuda a control con su médico tratante, para lo cual **DEBE** pedir una hora, una vez terminado el tratamiento.

Teléfonos de contacto.

Mantendremos una comunicación telefónica fluida.

Cualquier problema o duda acerca del tratamiento, como por ejemplo, malestares, día u hora de la toma de muestra, o cualquier otra pregunta, no dude en consultarnos.

Los teléfonos de contacto son los siguientes:

- QF. Felipe Hidalgo C: **9-82178515**
- Laboratorio de Farmacología y Toxicología,
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas,
Universidad de Chile: **9782885**
Lunes a viernes, de 9:00 a 21:00

Informativo al paciente.

Proyecto clínico:
Administración conjunta de Nitrofurantoína
y Matico en pacientes con infección
urinaria.



Servicio de Urología, Hospital Clínico Universidad de Chile.
Dirección de apoyo a la investigación clínica, Hospital Clínico
Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad
de Chile.
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Laboratorio Ximena Polanco.
Santiago, Mayo 2011.

La infección del tracto urinario, es una enfermedad muy común, que ataca las vías urinarias y que afecta mayoritariamente a mujeres. Se caracteriza principalmente por el dolor o ardor que se manifiesta al orinar y también por el aumento en la frecuencia urinaria.

La Nitrofurantoina es un antibiótico, que será utilizado en el tratamiento de su infección.

Al tomar Nitrofurantoina usted podría presentar malestares estomacales como: dolor, náuseas, vómitos, diarrea, etc.; además de dolor de cabeza o manifestaciones alérgicas en la piel (picazón o enrojecimiento). La aparición de éstos u otros síntomas, le será consultada telefónicamente durante el tratamiento, día por medio. **Si tiene alguna duda o consulta, no dude en comunicarse con nosotros, a los teléfonos adjuntos al final de este informativo.**

Las cápsulas de matico que le fueron proporcionadas tienen la finalidad de evitar estos efectos adversos que se asocian al uso de Nitrofurantoina.

Por lo tanto es muy importante que usted:

1. Tome las cápsulas de matico junto a los comprimidos de Nitrofurantoina.
2. Sea rigurosa en los horarios de la toma de medicamentos.
3. Cumpla con los 10 días de tratamiento que su médico le indicó.

Junto a este informativo se le entregará una tabla que podrá utilizar como recordatorio y control del tratamiento.

Los horarios de la toma de los medicamentos serán los siguientes:

1 comprimido NITROFURANTOÍNA + 1 cápsula de MATICO, en la mañana, a las:

1 comprimido NITROFURANTOÍNA + 1 cápsula de MATICO, en la noche, a las:

Fecha próxima toma de muestra.

El estudio en el que usted participa requiere de un segundo examen de sangre, por lo que **Deberá asistir el día** / / 2011, **entre las 8 y las 10 de la mañana, a la Dirección de Apoyo a la Investigación Clínica**, ubicada en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, 6to piso, sector E, oficina 616, con la E.U., Sra. Tamara Torres, para la toma de su muestra.

ANEXO 8

Cumplimiento terapia

Instrucciones: Marque una X en el espacio seleccionado,
una vez que haya tomado sus medicamentos

| | |
|-----------------------------|--|
| Fecha inicio de tratamiento | |
| Fecha término tratamiento | |
| Horario de administración | |

| Horario | Mañana | | Tarde | |
|---------|--|--------|-----------------|--------|
| | Nitrofurantoína | Matico | Nitrofurantoína | Matico |
| Día 1 | | | | |
| Día 2 | | | | |
| Día 3 | | | | |
| Día 4 | | | | |
| Día 5 | | | | |
| Día 6 | | | | |
| Día 7 | | | | |
| Día 8 | | | | |
| Día 9 | | | | |
| Día 10 | | | | |
| Día 11 | Concurrir a la toma de muestra. | | | |