



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DETERMINACIONES
CUANTITATIVAS QUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS
DE HETACILINA EN ALGUNAS FORMAS
FARMACEUTICAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
MARIA ESPERANZA HERNANDEZ KOELIG
MEXICO, D. F. 1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q.F.B. RAMON ULACIA ESTEVE
VOCAL: Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES
SECRETARIO: Q.F.B. MARIO MIRANDA CASTRO
1er. SUPLENTE: Q.F.B. LUZ DEL CARMEN CAMACHO
SUSUNAGA
2o. SUPLENTE: Q.F.B. MA. DE LOS ANGELES RODRI-
GUEZ ARANA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIOS GROSSMAN, S.A.

SUSTENTANTE:

MARIA ESPERANZA HERNANDEZ KOELIG

ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES

A LOS SRES:

FERNANDO HERNANDEZ CASAS
ISABEL KOELIG DE HERNANDEZ

Mis padres, que han sido -
guía y luz de mi camino.

A mi esposo SANTIAGO,
mi amor, por su gran
cariño, estímulo y -
comprensión.

Con mucho cariño a mis
hermanos:
RAFAEL, MIGUEL, ISABEL,
MA. DE LA LUZ Y MA. DEL
CARMEN.

Al Padre
ISMAEL SALAZAR

A mis Maestros,
A mis cuñados y sobrinos,
A mi tía Elena,
A mis familiares,
A mis amigos.

I N D I C E

	Pág.
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	3
III. REVISION BIBLIOGRAFICA	27
IV. PARTE EXPERIMENTAL	41
V. ESTUDIO ESTADISTICO	72
VI. CONCLUSIONES	90
VII. BIBLIOGRAFIA	95

I N T R O D U C C I O N

I N T R O D U C C I O N

En la actualidad el uso de los antibióticos es muy grande, extendiéndose cada vez más, por lo que ha sido necesario impulsar más la obtención de productos más estables.

Es el caso de la Hetacilina que es un antibiótico derivado semisintético de la penicilina y que actúa como un antibiótico de amplio espectro.

La necesidad de aplicar métodos exactos y reproducibles para Valoración de Hetacilina fue el objeto de este trabajo.

Se planearon los estudios de 2 métodos microbiológicos y 4 métodos químicos, comparando los resultados para seleccionar los de mejor aplicación en la materia prima y en formas farmacéuticas conocidas.

GENERALIDADES

G E N E R A L I D A D E S

El accidental descubrimiento de la penicilina por Sir Alexander Fleming en 1929 fue el factor principal en el comienzo de las fascinantes y fecundas investigaciones que han dado como resultado la obtención de los efectivos agentes anti-infecciosos conocidos comunmente como antibióticos.

Sin embargo, no fue hasta Florey y Chain y sus asociados en Oxford en 1940 que al aplicar los antibióticos en terapia, lograron que el descubrimiento de Fleming llegara a ser de gran significación en la Medicina práctica.

Un antibiótico se define como un compuesto químico derivado o producido por un microorganismo viviente y que es capaz de inhibir los procesos vitales o incluso destruir el crecimiento de microorganismos a bajas concentraciones. Aunque se han obtenido antibióticos de los tejidos de plantas y animales superiores, por costumbre se aplica la designa--

ción a las sustancias inhibitorias de origen microbiano.

Para que un antibiótico sea provechoso en terapia, deberá ser decisivamente efectivo contra microorganismos patógenos, sin producir efectos colaterales significativamente tóxicos. Deberá ser suficientemente estable de modo que pueda ser aislado y procesado, para que pueda ser almacenado por un espacio de tiempo razonablemente prolongado sin que haya apreciable pérdida de actividad. Es importante que sea fácil de tratar para procesarlo en formas de dosificación adecuada para que pueda ser absorbido rápidamente. Finalmente, la velocidad de desintoxicación y eliminación del cuerpo deberá ser tal que se requieran dosis relativamente poco frecuentes para mantener los niveles apropiados de concentración, también deberá ser lo suficientemente rápida y completa de modo que el medicamento pueda ser eliminado del cuerpo una vez que se haya descontinuado su administración.

La manera en que los antibióticos ejercen su acción contra organismos susceptibles, es variada. En la mayoría de los casos el mecanismo de acción no es conocido completamente, en pocos casos como penicilinas por ejemplo, el sitio de acción es conocido pero detalles precisos del mecanismo están bajo investigación.

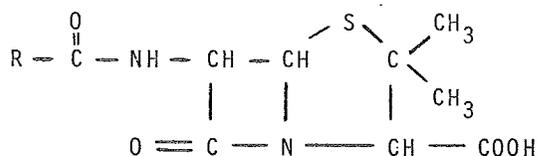
El desarrollo de nuevos y diferentes antibióticos es un paso muy importante en el tratamiento sobre organismos resistentes que con anterioridad, fueron susceptibles a un antibiótico más antiguo, ya que se han encontrado estafilococos resistentes a la penicilina y a la tetraciclina, causantes de graves problemas médicos. Solamente el desarrollo de nuevos antibióticos ha hecho posible el tratamiento de las enfermedades causadas por dichos organismos resistentes.

PENICILINAS

El nombre genérico de penicilina incluye al grupo de ambos agentes antibacterianos, el natural y el semisintético. Las penicilinas se obtienen por extracción de cultivos de los hongos *Penicillium notatum* o *Penicillium chrysogenum*, que crecen en medio especial. Pueden extraerse varias penicilinas químicamente relacionadas, pero el producto principal de los métodos de fermentación moderna es la penicilina G y sus sales utilizadas en la medicina clínica. La primera síntesis de penicilina se consiguió en 1957. Después del reciente aislamiento del ácido 6 aminopenicilánico, que es uno de los grupos básicos de ambas penicilinas, natural y semisintética, se han preparado otras nuevas formas de penicilina que difieren en las varias cadenas laterales.

También por biosíntesis se han conseguido nuevas penicilinas; el hongo formador de penicilina se desarrolla en un medio al que se le ha añadido una determinada sustancia química, de manera que el producto final sea una penicilina que tenga en su estructura una modificación química prevista. Entre las penicilinas nuevas que tienen en la actualidad un uso considerable se encuentran la penicilina V, la meticilina y la ampicilina.

Exámenes de la estructura de la penicilina muestran que está formada por un anillo beta lactámico de cuatro miembros, fusionado con un anillo de tiazolidina.



Desde un punto de vista clínico, las transformaciones más significativas de las penicilinas son causadas por el ácido gástrico y por enzimas llamadas penicilinasas.

Debido a esta serie de transformaciones indeseables, las recientes investigaciones se han centrado en el desarrollo de penicilinas resistentes a la hidrólisis ácida y al ataque de penicilinasas. En adición, algunas investigacio-

nes se han dirigido al desarrollo de penicilinas con actividades antibacteriales de espectro más amplio que la penicilina G. Como resultado se han obtenido cuatro clasificaciones de las penicilinas:

1. Las penicilinas naturales como la penicilina G, - en las cuales la porción acilo de la amida en la cadena lateral, consiste en un grupo bencilo o alquilo. La penicilina G, es la base de la terapia antibacterial. En pacientes no alérgicos a las penicilinas, la penicilina G es la de preferencia para el tratamiento y prevención de infecciones causadas por cocos susceptibles, incluyendo gonococos, estreptococos alfa hemolíticos y estreptococos del grupo A beta - hemolíticos, también es preferida para las infecciones causadas por *Treponema pallidum*, *Clostridium*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae* y algunas especies de *Actinomyces*. Se encuentra en forma de sales solubles en agua, - como las sales de potasio, sodio y calcio. La rápida eliminación de la penicilina del torrente sanguíneo, a través de los riñones y la necesidad de mantener un nivel adecuado de concentración en la sangre, han provocado la creación de sales aminadas de penicilina, de alto peso molecular como la penicilina G procaínica.

2. Las penicilinas ácido-resistentes, tales como la fenoximetil penicilina y la feneticilina, están formadas -- por un grupo fenoxi que ataca al carbono alfa de un grupo alquilo, el cual se encuentra unido al grupo amido de la --

cadena lateral. Ambas penicilinas mantienen niveles san -
guíneos más altos que la penicilina G, al administrarse en-
forma oral a la misma dosis y son más ácido estables, pero,
no presentan ventajas terapéuticas prácticas sobre dosis -
más altas de penicilina G bufferada.

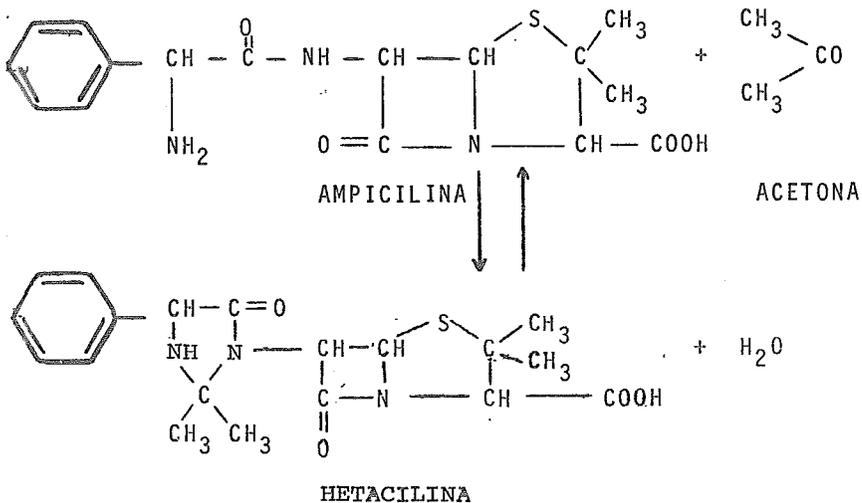
3. Las penicilinas resistentes a la penicilinasasa co -
mo la meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina y di -
cloxacilina, contienen un anillo de estructura y propieda-
des aromáticas, que ataca directamente el carbonilo del -
grupo amido de la cadena lateral. Son penicilinas de ac -
ción similar a las demás penicilinas, pero, son más efec-
tivas contra estafilococos resistentes a la penicilina, -
que son los productores de la penicilinasasa. El uso de es-
tas penicilinas se dirige al tratamiento de infecciones es -
tafilocóccicas resistentes en exclusiva, evitando de esta-
manera que la desmedida administración de las mismas desa-
rrolle resistencia a otros microorganismos, por lo que se
recomienda evitar su uso en infecciones causadas por orga-
nismos susceptibles a la penicilina G.

4. Las penicilinas de amplio espectro, como la car-
bencilina sódica, ampicilina y hetacilina, en las cuales -
varios cambios en la naturaleza de la porción acilo del -
grupo amido de la cadena lateral, producen penicilinas ine -
fectivas contra estafilococos productores de penicilasa, -

pero, más activas que la penicilina G, contra microorganismos Gram negativos como Haemophilus influenzae, algunas especies de Salmonella, Shigella y Pseudomonas, Escherichia coli y Proteus mirabilis.

HETACILINA

La Hetacilina o Acido 6-(2,2-dimetil-5-oxo-fenil-1-imidazolidinil) penicilánico, es un derivado semi sintético de la penicilina y se obtiene como producto de condensación, por reacción de la Ampicilina con acetona, que hace que el grupo 6-amino entre a un anillo imidazolidínico.



Esta penicilina semisintética se puede presentar como hetacilina anhidra o como hetacilina potásica.

Tiene propiedades anfotéricas, formando sales con ácidos y bases; su punto isoeléctrico es a pH 2.5, comparado con 4.7 para ampicilina.

Su vida media en soluciones acuosas diluidas a pH 1.0 y 25°C, es de 27 a 42 horas, contra 10 a 11 horas para ampicilina a las mismas condiciones.

Por sus características, la hetacilina tiene como principales propiedades: gran estabilidad en medio ácido, (mayor que para ampicilina) y amplio espectro antibacterial que incluye microorganismos Gram positivos y microorganismos Gram negativos.

Debido a su estabilidad frente al jugo gástrico constituye un mayor progreso en relación con la ampicilina, ya que puede ser administrada por vía oral, siendo químicamente estables las formulaciones que la contienen.

FARMACOCINETICA. Absorción, concentración en sangre y excreción.

Administración por vía oral: se efectuaron estudios-

comparativos entre hetacilina y ampicilina en 13 sujetos (9 hombres, 4 mujeres), cuyas edades fueron entre 21 y 48 años de edad, en buen estado de salud y sin problemas intestinales.

Un estudio cruzado con dos dosis fue llevado a cabo; cápsulas de 250 mg y de 500 mg, administrados con intervalos de 2 a 3 días. A la mitad de los sujetos se les administró la dosis de 250 mg y a la otra mitad la dosis de 500 mg, después de un intervalo de 3 semanas se administraron las dosis en forma cruzada (a los sujetos que se les administró la dosis inicial de 250 mg, en la segunda parte se les administró la dosis de 50 mg y viceversa).

Los sujetos estuvieron en ayuno y sin tomar bebidas hasta que se efectuaron las tomas de sangre 4 horas después de la administración. Para la dosis de 500 mg las muestras de sangre fueron tomadas a la 1/2, 1, 4, 6 y 8 horas después de la administración; en la segunda serie con la dosis de 250 mg las muestras de sangre a la 1,2,3,4 y 6 horas después de la administración.

El suero fue separado por centrifugación, almacenado a -20°C y analizado en un período menor a una semana.

Las muestras de orina de todos los sujetos fueron co-

lectadas con intervalos de dos horas. Las porciones de orina fueron almacenadas a -20°C y analizadas en período menor a 2 semanas.

Las concentraciones del antibiótico fueron determinadas por el método de cilindro-placa usando *Sarcina lutea* ATCC-9341, como organismo de prueba. Las soluciones patrón de referencia de hetacilina y ampicilina fueron preparadas en suero humano. Las dos penicilinas dieron idénticas líneas de regresión. El patrón de referencia de hetacilina fue usado para las muestras de hetacilina y el patrón de referencia de ampicilina se usó para las muestras de ampicilina; las muestras en estudio fueron diluídas en suero humano a las concentraciones del rango de la curva patrón. Las muestras de orina fueron diluídas con solución buffer de fosfatos pH 7.0.

Los resultados obtenidos de los estudios de la absorción oral, de hetacilina administrada en cápsulas, muestran que la absorción es solamente el 50% de la absorción para ampicilina, sin embargo, son más prolongados los niveles de concentración en sangre para hetacilina, sin encontrar un apreciable decremento en la máxima concentración. A las 6- y 8 horas después de la administración las concentraciones fueron ligeramente más altas para hetacilina en relación con la ampicilina (Fig. 1).

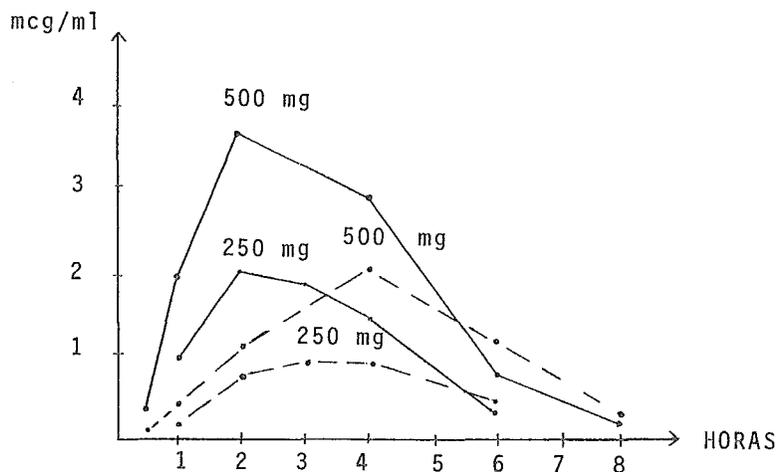
Para la dosis de 250 mg, la máxima concentración en suero fue solamente de 45% en relación a ampicilina y para la dosis de 500 mg fue de 55%.

La determinación de la excreción urinaria de los compuestos, también indica que para hetacilina, la absorción en el tracto gastrointestinal es solamente la mitad de la absorción para ampicilina. Para la dosis de 250 mg la ex-creción fue de 55% y para la de 500 mg fue de 53%.

En los estudios realizados se determinó que la hidrólisis de hetacilina en solución acuosa, sigue una reacción de primer orden; la vida media es solamente de 30 minutos a un pH de 3.0 a 8.0. A pH más bajos la hetacilina es más estable.

Otros estudios efectuados indican que la presencia -- de alimento en el estómago disminuye la absorción de hetacilina en alta proporción en relación a la absorción para ampicilina.

FIGURA No. 1



ABSORCION ORAL DE AMPICILINA Y HETACILINA
EN SUJETOS EN AYUNAS

————— AMPICILINA

----- HETACILINA

Administración por vía intramuscular. Los sujetos - que tomaron parte en los estudios efectuados fueron hombres - y mujeres saludables, de 18 a 49 años de edad. Se llevaron - a cabo estudios cruzados, en grupos a los que se les adminis - tró hetacilina o ampicilina; las dosis empleadas fueron - 250 mg y 500 mg y el intervalo de tiempo entre una adminis - tración y otra fue de una semana.

Las muestras de sangre fueron tomadas normalmente a la 1/2, 1, 2, 4 y 6 horas después de la administración del com - puesto. En ciertos estudios se tomaron las muestras a las 3 y 8 horas.

Después de la separación del suero las muestras fueron analizadas en el mismo día, excepto cuando las muestras fue - ron tomadas a las ocho horas tuvieron que ser conservadas a - 4°C antes de analizarlas. Durante el período de 6 horas des - pués de la administración, la orina fue colectada para medir el contenido de antibiótico.

Las concentraciones del antibiótico en suero fueron me - didas por la técnica de difusión en agar con *Sarcina lutea* - como organismo de prueba. Las muestras de suero fueron di - luídas en suero humano normal, o en algunos estudios en albú - mina de plasma bovino; las soluciones patrón de referencia - para hetacilina y ampicilina fueron preparadas en los mismos

diluentes. Las placas fueron incubadas a 30°C.

Las muestras de suero y orina de los sujetos que recibieron ampicilina fueron analizadas usando patrón de referencia de ampicilina, los que recibieron hetacilina se analizaron contra patrón de referencia de hetacilina. Las soluciones patrón para hetacilina y ampicilina dieron los mismos diámetros en las zonas de inhibición.

Para su administración, los compuestos fueron disueltos en 2 ml de agua estéril e inyectados inmediatamente por vía intramuscular. La hetacilina fue administrada como sal de potasio y la ampicilina como sal de sodio, en dosis equivalentes a 250 mg y 500 mg de ampicilina en su forma ácida. La ampicilina fue absorbida más rápidamente y los picos de concentración en suero, obtenidos una hora después de la administración, fueron casi dos veces más altos que los picos de concentración en suero para hetacilina después de dos horas de la administración (Fig. 2).

Los niveles en suero medidos en sujetos que recibieron hetacilina, disminuyeron más lentamente y fueron más altos que los de los grupos que recibieron ampicilina, a las 4 y 6 horas después de la administración de las sustancias.

Después de la administración de hetacilina, la recuperación

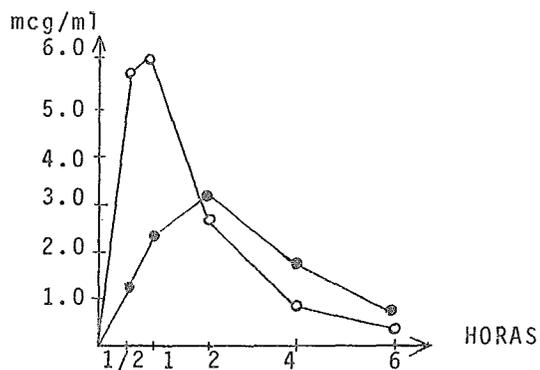
ración en orina a través de un período de 6 horas después de la administración, fue ligeramente menor que la de ampicilina.

Estudios electroforéticos muestran que solamente pequeñas cantidades de hetacilina, sin hidrolizar, persisten en el torrente sanguíneo durante 150 minutos después de la administración intramuscular. Esto indica que la hetacilina es escasa o ligeramente absorbida después de la inyección y que tarda en hidrolizarse a ampicilina, forma en la que se absorbe principalmente.

La hidrólisis de hetacilina fue rápida, de modo que, más o menos 15 minutos a 37°C más del 50% de una solución acuosa conteniendo 1.0 mg/ml de hetacilina en buffer de fosfatos pH 7.0 fue hidrolizada a ampicilina y después de 60 minutos no hubo cambios.

La velocidad de hidrólisis en condiciones ácidas a pH 2.0 fue menos rápida, pero después de 60 minutos el 50% de hetacilina fue convertido a ampicilina.

FIGURA No. 2



CONCENTRACION EN SUERO EN 8 SUJETOS DESPUES
DE ADMINISTRAR UNA DOSIS DE 250 mg DE HETA-
CILINA Y AMPICILINA POR VIA INTRAMUSCULAR.

O AMPICILINA

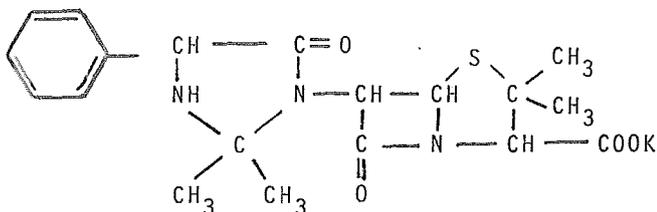
● HETACILINA

HETACILINA POTASICA

Nombre químico

Sal potásica del ácido 6-(2,2 - dimetil - 5 - oxo - 4 - fenil - 1 - imidazolidinil) penicilánico.

Fórmula desarrollada



Fórmula condensada



Peso molecular

427.59

Descripción

Polvo microcristalino, blanco o ligeramente amarillento, inodoro o con ligero olor característico, sabor amargo.

Solubilidad

Soluble en agua, insoluble en solventes orgánicos.

Potencia

No menor de 735 mcg por miligramo equivalente a ampicilina. Su contenido de hetacilina potásica es no menor de 90% ni mayor de 105%.

Humedad

Su contenido de humedad deberá ser no mayor de 1.0 - por ciento.

pH

En solución acuosa conteniendo 10 miligramos por mililitro, deberá ser no menor de 7.0 ni mayor de 9.0.

Identificación

Positiva para potasio.

Positiva, cuando el espectro de absorción en infrarrojo, es el mismo que el espectro de absorción del patrón de referencia.

Rotación específica

En una solución acuosa al 1.0 por ciento (peso/volumen), usando una polarímetro Perkin Elmer 141 (o instrumento equivalente), es cerca de 285°.

Toxicidad

Deberá pasar la prueba, al administrarse 0.5 ml, de una solución conteniendo 8 mg/ml de actividad en solución de cloruro de sodio libre de pirógenos, por vía intravenosa a cinco ratones de 18 a 25 gramos de peso.

Pirógenos

Aplicable sólo para productos inyectables. Los productos inyectables deberán cumplir los requerimientos de ausencia de pirógenos de acuerdo a la prueba. Administrar 1.0 ml por kg de peso, de una solución conteniendo 18 mg/ml de actividad equivalente a ampicilina en solución salina, a cada uno de tres conejos de no menos de 1.5 kg de peso.

Formas farmacéuticas de administración y dosis aplicada

Vía oral:

Cápsulas, conteniendo hetacilina potásica equivalente a 112.5, 225 o 450 miligramos de ampicilina.

Tabletas, conteniendo hetacilina potásica equivalente a 112.5 mg de ampicilina.

Suspensión oral, conteniendo hetacilina potásica equivalente a 22.5, 45 o 112.5 mg de ampicilina por mililitro, al reconstituirse.

Vía intramuscular:

Hetacilina potásica equivalente a 225 mg o 450 mg miligramos de ampicilina; conteniendo en adición 20 miligramos de clorhidrato de lidocaína.

Vía intravenosa:

Hetacilina potásica equivalente a 225 mg o 450 mg de ampicilina.

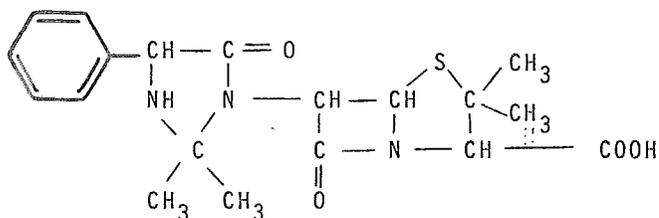
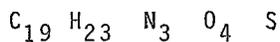
Dosis:

La cantidad administrada de hetacilina potásica, equivalente a ampicilina, será de 450 a 900 miligramos, - cada 6 horas y diariamente. Siendo la misma para las vías: oral, intramuscular e intravenosa.

HETACILINA ANHIDRA

Nombre químico

Acido 6-(2,2 - dimetil - 5 - oxo - 4 fenil - 1-imidazolidinil) penicilánico.

Fórmula desarrolladaFórmula condensadaPeso molecular

389.48

Descripción

Polvo microcristalino, blanco o ligeramente amarillento

to, inodoro o con ligero olor característico y sabor amargo.

Solubilidad

Prácticamente insoluble en agua y solventes orgánicos. Soluble en soluciones diluídas de hidróxido de sodio- (pH 7 - 8), en dimetilformamida, dimetilsulfóxido y piridina. Soluble en metanol pero con descomposición.

Potencia

No menor de 810 mcg por miligramo equivalente a ampicilina. Su contenido de hetacilina deberá ser no menor de 90% ni mayor de 105%.

Humedad

Su contenido de humedad no deberá ser mayor de 1.0 - por ciento.

pH

En solución acuosa conteniendo 10 miligramos por mililitro, deberá ser no menor de 2.5 ni mayor de 5.5

Identificación

Positiva, cuando el espectro de absorción en infrarrojo es el mismo que el espectro de absorción del patrón de referencia.

Rotación específica

En una solución de piridina al 1.0 por ciento (peso/volumen), usando un polarímetro Perkin Elmer 141 (o instrumento equivalente), es de 340° a 370° .

Toxicidad

Deberá pasar la prueba, al administrarse 0.4 ml, de una solución conteniendo 45 mg/ml de actividad en solución-salina, por vía intravenosa a cinco ratones de 18 a 25 gramos de peso.

REVISION BIBLIOGRAFICA

REVISION BIBLIOGRAFICA

G.A. Hardcastle, Jr., D.A. Johnson, y C.A. Panetta, - describieron un nuevo compuesto llamado Hetacilina, que es el nombre genérico del Acido 6 -(2,2 -dimetil - 5 - oxo - 4 -fenil - 1 - imidazolidinil) penicilánico, el cual es un de rivado del Acido 6- aminopenicilánico, en el que el grupo 6- amino es parte de un anillo imidazolidínico.

Este compuesto fue preparado por reacción de acetona- con el Acido 6- [D-(-)-~~α~~-aminofenilacetamido] penicilánico, que es la importante penicilina semisintética, genéricamente conocida como Ampicilina.

Las principales propiedades de la Hetacilina son: su marcada estabilidad en medio ácido y el amplio espectro antibacteriano que incluye gérmenes Gram- positivos y Gram- - negativos. Debido a que es un compuesto ácido- estable, - constituye un mayor progreso en comparación con la Ampicilii

na, ya que puede ser fácilmente administrada por vía oral, de modo que las formulaciones que la contienen conservan -- la misma estabilidad química (11).

Como la Hetacilina es un derivado de la Ampicilina, -- varios investigadores llevaron a cabo pruebas comparativas -- entre ambos compuestos para calcular la absorción después -- de ser administrados en el Hombre.

Paul A. Bunn, S. Milicich, y J.S. Lunn observaron, -- después de la administración oral en sujetos humanos, nive- -- les máximos de concentración en sangre a las 2 horas y can- -- tidades mayores de 0.1 mcg/ml persistiendo hasta las 8 ho- -- ras. Los niveles para Hetacilina fueron más bajos que para Ampicilina, pero después de la tercera hora permaneció en -- la sangre por períodos más largos y a concentraciones más -- altas que la Ampicilina. Se observó además, que la presen- -- cia de alimento en el estómago disminuye la absorción (5).

William M.M. Kirby y Allan C. Kind, confirmaron lo -- establecido por los investigadores anteriores, de modo que -- en la administración oral y comparados con las penicilinas -- G y V, así como con la feneticilina, los niveles sanguíneos de Hetacilina y Ampicilina son elevados más lentamente pero por tiempos más prolongados. Por otro lado, los niveles pa -- ra Hetacilina son lentamente elevados pero son más prolonga

dos que para Ampicilina.

Las administraciones intramuscular e intravenosa, producen niveles sanguíneos más altos que la vía oral; estos niveles más altos son de gran significancia en la terapia - de los organismos más resistentes y donde la penetración tisular puede ser de gran importancia.

Durante un estudio efectuado al aplicar dosis de penicilina G, Ampicilina y Hetacilina, por vía intravenosa, se observó que un 75 por ciento de la cantidad administrada - tanto para penicilina G como para Ampicilina, fueron recobrados en la orina, obteniéndose un 93 por ciento para la - Hetacilina.

El hecho de la obtención del 93 por ciento en la orina, indicó que la Hetacilina fue más resistente a la inactivación hepática que la Ampicilina (15).

L. Magni, B. Ortengren, B. Sjoberg y S. Wahlquist, -- llevaron a cabo investigaciones sobre la excreción urinaria después de la administración oral de Hetacilina y Ampicilina.

La absorción y excreción características de Hetacilina fueron definidas en comparación a Ampicilina por estudios

cruzados en sujetos normales. El pico promedio máximo de concentración en suero y la excreción urinaria, obtenidos con Hetacilina, fueron solamente la mitad de lo que se obtuvo con Ampicilina. Sin embargo, a las 6 y 8 horas después de la dosificación, las concentraciones fueron ligeramente más altas para Hetacilina.

El patrón de absorción para Hetacilina fue similar al que otros autores anteriormente observaron con tabletas de Ampicilina de liberación sostenida. La baja velocidad de absorción de la Hetacilina así como la rápida hidrólisis al pH del jugo duodenal, pueden explicar esta similitud (17).

Salud B. Tuano, M.D., Lee D. Johnson, M.D., Jean L. Brodie y William M.M. Kirby, M.D., una vez efectuadas sus investigaciones, encontraron que las velocidades de excreción urinaria para penicilina G, Ampicilina y Hetacilina, después de administrarse por vía intravenosa eran: 75 por ciento de la cantidad administrada de penicilina G y 75 por ciento de Ampicilina, a diferencia de las anteriores encontraron 90 por ciento para Hetacilina, indicando que el mecanismo renal era el principal responsable de la diferencia en los niveles sanguíneos.

Estos resultados indicaron que 6 gramos de Hetacilina por día, u 8 gramos de Ampicilina deberían ser equivalentes

a 12 gramos de penicilina G (19,200,000 unidades), en la terapia de serias infecciones bacteriales (27).

R. Sutherland y O.P.W. Robinson obtuvieron la concentración mínima inhibitoria de Hetacilina y Ampicilina, al hacer diluciones seriales contra los gérmenes más importantes (Tablas 1 y 2).

Determinaron que el espectro antibacterial y actividades in vitro para Hetacilina y Ampicilina eran idénticas y que probablemente la actividad antibacterial de Hetacilina era debida al producto de la hidrólisis que es la Ampicilina. Estudios electroforéticos del suero después de la administración de Hetacilina en voluntarios, indicaron que la mayor parte del antibiótico en circulación fue en forma de Ampicilina. Estudios cruzados después de la administración por vía oral e intravenosa de Hetacilina y Ampicilina, mostraron que la Ampicilina producía, consistentemente, elevados picos de concentración en sangre.

La cantidad de antibiótico excretada en la orina en un período de 6 horas fue considerablemente menor en el caso de Hetacilina, obteniéndose bajas concentraciones en suero, de modo que la absorción fue más lenta que la de la Ampicilina. Concluyeron de estos estudios que la Hetacilina poseía una eficiencia terapéutica inferior comparada con Am

picilina. (24)

En relación a la tolerancia, varias investigaciones - permitieron asentar que la Hetacilina es bien tolerada después de la administración oral y de la parenteral.

F. de Ritis y C. Scioli, indicaron haber curado 38 pacientes con una alta dosis por vía intravenosa (3 gramos al día en dosis divididas) y que ninguno de los casos presentó la necesidad de detener el tratamiento, por lo que fue continuado hasta 12 días. Al llevarse a cabo las pruebas se - encontró que, si la Hetacilina y la Ampicilina son administradas intravenosamente en las dosis mencionadas, eran capaces de alcanzar altas concentraciones en el tracto biliar - por lo cual se hicieron efectivas en el tratamiento para infecciones biliares (9).

Donald B. Louria y Myron Schultz, reportaron que al - administrarse Hetacilina por vía oral e intramuscular, solamente en 3 casos de 33 se notaron efectos colaterales como - prurito, resolviéndose al detener el tratamiento. Ninguna - alteración renal o hematológica fue reportada (16).

TABLA No. 1

ACTIVIDADES ANTIBACTERIANAS DE AMPICILINA Y
HETACILINA

ORGANISMO	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (mcg/ml)	
	AMPICILINA	HETACILINA
Escherichia coli 0111	2.5	2.5
(o) Klebsiella aerogenes A	500.0	500.0
Salmonella typhi	1.25	1.25
Salmonella typhimurium	1.25	1.25
Shigella flexneri	2.5	2.5
Proteus mirabilis	1.25	1.25
(o) Proteus mirabilis 889	500.0	500.0
Proteus morganii H	50.0	50.0
Pseudomonas pyocyanea	500.0	500.0
Haemophilus influenzae	0.5	0.5
(o) Staphylococcus aureus	250.0	250.0
Staphylococcus aureus	0.05	0.05
Streptococcus pyogenes	0.02	0.02
Streptococcus pneumoniae	0.05	0.05
Streptococcus faecalis	1.25	1.25

(o) Cepas reproductoras de penicilinas

TABLA No. 2

EFFECTO DEL SUERO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE AMPICILINA Y HETACILINA CONTRA S. AUREUS SMITH

COMPUESTO	% EN UNION CON SUERO HUMANO	CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA mcg/ml	
		En caldo nutritivo	En suero humano
AMPICILINA	16	0.03	0.03
HETACILINA	16	0.03	0.03

A. Razzi, en un estudio pediátrico efectuado, indicó - que al administrarse Hetacilina en 54 niños, en dosis de 25- mg por kilo de peso, diariamente y por períodos prolongados- de tiempo, no se observaron efectos tóxicos ni colaterales - (20).

Calvin W. Hoffpauir, Susan M. Sandstrom y Margaret H. D. Smith, reportaron que en los exámenes hepático, renal y- hemático, llevados a cabo en infantes tratados con Hetacili- na, no se encontró ninguna indicación de efecto tóxico del- medicamento (12).

Jorge E. Howard y Juan Pablo Beca, señalaron la au -

sencia de toxicidad y efectos colaterales, debida a la terapia con Hetacilina. Llevaron a cabo sus investigaciones al tratar 105 pacientes, afectados por diferentes infecciones, curándolos con Hetacilina; el 10 por ciento presentó efectos colaterales, en la mayoría de los casos reacciones de hipersensibilidad tales como erupciones en la piel y urticaria. En estos casos al detener el tratamiento, terminaron las reacciones indicadas; cuando los efectos colaterales fueron representados por vómito y diarrea, no fue necesario detener el tratamiento a excepción de uno solo de los casos.

Estos investigadores concluyeron que los efectos colaterales son ocasionales, considerando entonces a la Hetacilina como un medicamento bien tolerado (14).

Eugene A. De Felice, Dilip J. Mehta, Milton M. Cahn y Edwin J. Levy, llevaron a cabo investigaciones de tolerancia de Hetacilina. Administraron el medicamento por vía oral a voluntarios sanos en diferentes dosis (de 2.0 a 4.0-gramos por día) durante 28 días. Los pacientes tratados con la dosis mayor (4.0 gramos en 24 horas), mostraron ligera diarrea y pequeñas trazas de sangre en las heces, esto último debido probablemente a la alteración en la flora bacteriana normal y a la inflamación intestinal.

Hicieron notar que los efectos colaterales indicados,

no representaron un problema que interfiriera en la actividad normal de los pacientes tratados. Determinaron también que la administración de Hetacilina (2.0 a 4.0 gramos diariamente por 28 días sucesivos), fue bien tolerada y libre de reacciones adversas y efectos tóxicos (8).

Debido a que la Hetacilina cuenta con amplio espectro antibacterial, particularmente activo contra gérmenes Gram-negativos y como indicación terapéutica su característica - propiedad de concentrarse en los tractos biliar y urinario, se han llevado a cabo investigaciones para el tratamiento - de diversas infecciones bacteriales incluyendo a las biliares y a las urinarias.

P.H. Azimi y H.G. Cramplett, estudiaron la efectividad terapéutica de la Hetacilina administrada a niños afectados por varias infecciones bacterianas. Se obtuvieron - buenos resultados al tratar pacientes con bronconeumonía y otitis media debida a *Diplococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y cepas de estafilococos no productores de penicilinas, así como estreptococos beta hemolíticos Grupo A.

Reportaron buenos resultados al curar a 8 pacientes - de 14 afectados por gastroenteritis debida a *Shigella* y a 2 transmisores de *Shigella*. En 3 casos los gérmenes presentaron resistencia, mientras que solamente en un caso se repor

tó una recaída. 3 niños con gastroenteritis debida a Salmonella fueron clínicamente curados con Hetacilina, bacteriológicamente este germen patógeno presenta sensibilidad al compuesto. Pero 2 de los 3 pacientes tuvieron una recaída bacteriológica. Dos casos de infección crónica del tracto urinario debida a E. coli, fueron curados con Hetacilina, aunque fue reportada una recaída después del tratamiento (2).

C. Scioli, M.D. y G. Giusti, M.D., estudiaron los efectos de la Hetacilina en 42 casos de fiebre tifoidea debida a Salmonella typhi, reportaron la alta efectividad de este compuesto. Consideraron que es más efectiva a una dosis de 6 gramos diariamente por un período de 1 a 4 días y encontraron elevadas concentraciones del antibiótico no solo en suero sino también en el tracto biliar, habiendo sido demostrado en el Hombre y en los animales (22).

M.I. Page, hizo un estudio de la efectividad terapéutica de Hetacilina, dada en 43 casos de varias infecciones. 14 casos de neumonía neumocócica, uno con bacteremia, fueron rápidamente curados y los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos con penicilina G; 5 casos de bronquitis neumocócica purulenta y 9 casos de pielonefritis debida al paracolon fueron curados con Hetacilina. Los resultados obtenidos fueron buenos en todos los casos; en un caso de lupus eritematoso tratado con esteroides, fue producida una infección por E. coli y se administró Hetacilina curándose rápidamente

y obteniendo orina estéril a los 6 meses después del tratamiento. Un paciente de 80 años quien después de una prosta tectomía fue afectado por pielonefritis bacteriana por *S. aureus*, fue curado con Hetacilina observándose la orina estéril por cuatro meses sucesivos. En todos los casos descritos, la Hetacilina permitió la obtención de un patrón urinario negativo en un margen de 24 horas. Siete pacien - tes afectados por infecciones del tracto urinario bajo, fue ron curados. Los investigadores puntualizaron que los ca - sos reportados como desfavorables, fueron debidos a la baja dosis administrada (1 gramo al día durante 10 días). Los enfermos seriamente afectados por diferentes tipos de infec ciones fueron curados sucesivamente (18).

M.H.D. Smith, S.M. Sandstrom y C.W. Hoffpauir, usaron Hetacilina para curar a siete pacientes afectados por menin gitis bacteriana aguda debida a *H. influenzae* N. menigitidis y *D. pneumoniae*. Todos los pacientes cuyas edades fluctuaban entre 7 meses y 3 años, se les administró el medicamento por vía oral, intramuscular e intravenosa. En 6 casos una resolución completa fue reportada. En otro de los ca - sos, aún cuando el fluido cerebrospinal llegó a ser estéril, las lesiones cerebrales fueron tan graves que el paciente fue excluido de la investigación.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los investiga-

dores concluyeron que la Hetacilina puede ser el medicamento utilizado en la terapia de la meningitis bacteriana aguda, común en niños (23).

L.B. Hogan, M.D., W.J. Holloway, M.D. y E.G. Scott, - M.S., curaron 105 pacientes con Hetacilina. Incluyeron infecciones como: bronquitis, neumonía, abscesos pulmonares, faringitis, infecciones del tracto urinario, inflamaciones pélvicas, salmonelosis, actinomicosis, endocarditis bacteriana y ligeras infecciones tisulares. Los resultados obtenidos fueron: 79 por ciento de respuestas satisfactorias, 15 por ciento de fracasos y 7 por ciento de resultados indeterminados.

Los resultados de estas investigaciones indicaron que la Hetacilina proporciona niveles antibacteriales satisfactorios en infecciones causadas por una gran variedad de microorganismos Gram- positivos y Gram- negativos. Los microorganismos más resistentes a la Hetacilina fueron: Pseudomonas, Klebsiellae y Salmonellae (13).

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL
METODOS DE PRUEBA

METODO MICROBIOLOGICO

Objetivo. La actividad de Hetacilina se mide por método microbiológico de difusión en placa y se basa en la lectura del diámetro de las zonas de inhibición, que se producen por una concentración estimada de antibiótico, sobre el microorganismo de prueba y por comparación de estos diámetros con los que se producen por la concentración del antibiótico patrón de referencia.

Se preparan varias diluciones del patrón de referencia a diferentes concentraciones, que servirán para construir la curva patrón de referencia, la cual será usada para comparar la actividad del producto problema.

Microorganismo de prueba. El microorganismo de prueba

ba que generalmente se usa en *Sarcina lutea* ATCC 9341: puede usarse también *Stafilococcus aureus* ATCC 6538P.

- a) *Sarcina lutea*: Bacterias Gram positivas en forma de esferas de 1.0 a 1.5 micras de diámetro. La división ocurre bajo condiciones favorables en tres planos perpendiculares, produciendo paquetes regulares. Son no-móviles, aerobios, la temperatura óptima a la que se desarrollan es de 25°C.

Son saprófitos y facultativamente parásitos, habitan en el aire, tierra y agua, así como en la superficie de la piel.

En agar crecen colonias amarillentas y brillantes, son circulares, granulares, enteras y húmedas.

En caldo forman abundante sedimento y lo mantienen claro.

- b) *Stafilococcus aureus*: Bacterias Gram positivas, en forma de esfera de 0.8 a 1.0 micras de diámetro, presentándose individualmente, en pares, en cadenas cortas y en grupos irregulares. Son no-móviles, aerobios, facultativamente anaerobios, su temperatura óptima de desarrollo es a 37°C pero crecen entre 10°C y 45°C, toleran grandes concentraciones de sal, crecen en un medio conteniendo 10% de cloruro de sodio. Bajo condiciones favorables producen no solo exotoxi-

nas (dermatotoxinas y hemotoxinas), sino también enterotoxinas como la enterotoxina causante de la toxicidad en los alimentos.

Son gérmenes patógenos causantes de furunculosis, osteomielitis y supuración de heridas, habitan particularmente en la mucosa nasal y en la piel, pueden ser aislados de pus en las heridas infectadas.

Los cultivos típicos de *Stafilococcus aureus* desarrollan fácilmente, variantes que crecen como colonias blanquecinas; dichas colonias frecuentemente desarrollan especies que asimismo producen el típico color naranja.

En agar crecen como colonias circulares, lisas, enteras, de color que va del naranja al blanco brillante. En agar sangre producen normalmente una beta hemólisis.

1. METODOS MICROBIOLOGICOS

1.1 Método de difusión en placa con discos de papel

a) Material

Usar discos de papel filtro de 9 milímetros de diámetro.

b) Medios de cultivo

Usar Agar Medio No. 2 y No. 1 (Difco), ajustado a un pH de 7.9-8.0 después de esterilizado, para la capa -

base y la capa semilla.

c) Buffer pH 7.8

Preparar una solución de fosfato de sodio dibásico al 3.58 por ciento y otra solución de fosfato de sodio - monobásico al 1.36 por ciento. Agregar la segunda solución a la primera, hasta obtener un pH de 7.8

d) Microorganismo e inóculo

El microorganismo usado es *Stafilococcus aureus* ATCC-6538P. Transferir un cultivo de *Stafilococcus aureus* del mantenido en botella Roux, sobre medio para la primera capa, dejarlo incubar durante 18 horas a 37°C. Remover el microorganismo con solución salina estéril, agitando y de modo que se obtenga una suspensión homogénea que debidamente diluída dé una lectura del 10 por ciento de transmisión a 650 milimicras en un espectrofotómetro adecuado.

Con esta suspensión, inocular el medio para la segunda capa en una relación de 2 por ciento.

e) Preparación de las placas

Esterilizar placas petri en un horno a 180°C durante 2 horas. Agregar 21 mililitros del medio no inoculado dentro de cada placa, mantenerlas entre 48°-50°C y dejar solidificar hasta formarse una masa uniforme. A

gregar 4 mililitros del medio inoculado a cada placa, el medio deberá mantenerse durante su distribución en baño de agua a 47°C.

Las placas deberán ser usadas el mismo día de su preparación.

f) Solución patrón de referencia

Pesar cuidadosamente una cantidad exacta de 20 mg de Hetacilina como patrón de referencia. Diluir con solución buffer de fosfatos pH 7.8, hasta obtener una concentración de 1000 mcg/ml de Hetacilina. De esta solución diluir hasta tener 100 mcg/ml y preparar las siguientes concentraciones, diluyendo siempre con buffer pH 7.8.

1.0 ml de la solución de 100 mcg/ml diluída a 100 ml (1.0 mcg/ml)

1.5 ml de la solución de 100 mcg/ml diluída a 100 ml (1.5 mcg/ml)

2.0 ml de la solución de 100 mcg/ml diluída a 100 ml (2.0 mcg/ml)

2.5 ml de la solución de 100 mcg/ml diluída a 100 ml (2.5 mcg/ml)

3.0 ml de la solución de 100 mcg/ml diluída a 100 ml (3.0 mcg/ml)

La concentración de 2.0 mcg/ml se usará como punto de referencia y será incluída en cada placa de las preparadas para la curva patrón y para la muestra.

g) Preparación de la muestra

Pesar cuidadosamente 20 miligramos de la muestra por probar, disolver en suficiente buffer de fosfatos pH-7.8 al transferir la muestra en un matraz aforado de 100 ml, diluir a tener una concentración de 2 mcg/ml- (punto de referencia sobre la curva patrón).

h) Procedimiento

Preparar tres placas para cada punto de la curva patrón (excepto la de 2 mcg/ml), y distribuir el antibiótico dentro de cada una alternadamente, remojando pequeños discos de papel filtro en la solución intermedia (2 mcg/ml) y en una concentración de la curva, formando un hexágono regular. Efectuar lo mismo para cada una de las diferentes concentraciones de la curva patrón.

Para la muestra por probar, usar tres placas y distribuir, la dilución obtenida, alternadamente con la solución patrón de referencia de 2 mcg/ml.

Colocar las placas cuidadosamente sobre charolas e incubarlas a 37°C durante 16 horas.

Después de incubar, medir el diámetro de las zonas de inhibición usando un vidrio de doble aumento.

i) Estimación de potencia

Preparar la curva patrón, calculando el promedio de los diámetros leídos para cada concentración y para -

los puntos de referencia, después calcular el promedio total considerando el punto de referencia para cada placa.

a = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 1.0 mcg/ml.

b = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 1.5 mcg/ml.

c = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 2.0 mcg/ml.

d = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de 2.5 mcg/ml.

e = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 3.0 mcg/ml.

Teniendo los promedios de las zonas de inhibición de todas las concentraciones, calcular según la siguiente ecuación:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

Donde:

L = diámetro en mm. de la zona de inhibición de la concentración más baja.

H = diámetro en mm. de la zona de inhibición de la -
concentración más alta.

En papel semilogarítmico, anotar las concentraciones del antibiótico en mcg/ml, en el eje de las ordenadas y el diámetro de las zonas de inhibición en las abscisas. Tra -
zar la curva usando los valores encontrados para L y H.

Interpolar en la curva para encontrar la lectura en -
mm., que deberá dar la concentración de referencia corregida (2.0 mcg/ml).

Para determinar la potencia de la muestra, promediar los diámetros de las zonas de inhibición del patrón de referencia y los diámetros de las zonas de inhibición de la --
muestra en las tres placas usadas. Si el promedio del diámetro de las zonas de inhibición del patrón de referencia, -
es mayor que la lectura corregida en la curva, para esa mis
ma concentración, la diferencia entre los dos se resta a la
lectura promedio de la muestra; si por lo contrario, el -
promedio del diámetro de las zonas de patrón de referencia -
es menor que el encontrado para esa misma concentración en
la curva, la diferencia entre los dos se suma al promedio -
encontrado para las zonas de la muestra.

Leer en la curva la concentración correspondiente al-

valor corregido de los diámetros de la muestra.

Multiplicar la concentración encontrada, por la dilución efectuada para obtener el contenido total de la muestra.

1.2 Método cilindro-placa

a) Material

Usar cilindros de acero inoxidable con un diámetro exterior de 8 mm. (± 0.1 mm) y un diámetro interior de 6 mm (± 0.1 mm) y una altura de 10 mm (± 0.1 mm).

b) Medios de cultivo

Usar Agar Medio No. 1 (Difco), ajustado el pH de 7.9-8.0 después de esterilizado, para la capa base y la capa semilla.

c) Solución patrón de referencia

Usar ampicilina trihidratada como patrón de referencia. Pesar cuidadosamente 20 mg de ampicilina, transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en suficiente buffer de fosfatos pH 8 (0.1 M) y diluir a tener una solución patrón. Esta solución puede guardarse en el refrigerador a temperatura cercana a los 10°C y puede usarse dentro de los 7 días siguientes, a par

tir de su preparación. De esta solución patrón hacer diluciones apropiadas en solución de fosfatos pH 8, - para tener las siguientes concentraciones: 0.064, - 0.08, 0.10, 0.125 y 0.156 microgramos de actividad - por mililitro.

d) Preparación de la muestra

Pesar cuidadosamente 20 mg aproximadamente, de muestra. Transferir a un matraz aforado de 100 ml, disolver en suficiente buffer de fosfatos pH 8 y efectuarlas diluciones necesarias para tener una concentración de 0.1 mcg de actividad por mililitro.

e) Preparación del organismo prueba

(*Sarcina lutea* ATCC9341). Mantener el organismo de prueba en tubos inclinados conteniendo medio de cultivo No. 1 (Difco) pH 8. Transferir a tubos de agar fresco cada semana. El inóculo en las placas puede ser preparado como sigue: desarrollar el organismo en tubos de agar inclinado e incubar por 24 horas a 32 - 35°C. Usar 3 ml. de solución salina estéril, la var el desarrollo de la superficie del tubo y pasarlo a una botella de Roux conteniendo 300 ml del medio No. 1, distribuir la suspensión en toda la superficie del medio con ayuda de perlas de vidrio estériles.

f) Estandarización de la suspensión

Determinar la dilución de esta suspensión para que pueda dar 20% de luz de transmisión, cuando se lea en un espectrofotómetro a 580 m μ . Esta suspensión ajustada es usada para preparar el inóculo de las placas y para determinar la cantidad de suspensión que debe ser añadida a cada 100 ml. de agar, efectuar pruebas hasta obtener zonas de inhibición claras y precisas, con un tamaño adecuado. Esta cantidad es usualmente de 1.5 a 2.0 ml.

g) Preparación de las placas

Añadir 21 ml. de agar base Medio No. 1 pH 8 fundido, a cada placa petri (20 x 100 mm.). Distribuir el agar cuidadosamente, tapar las placas y dejar endurecer el agar.

Fundir suficiente Medio No. 1 pH 8, enfriar a 48°C y añadir 4 ml a cada una de las placas conteniendo los 21 ml de la capa base no inoculada.

Inclinar las placas hacia atrás y hacia adelante para distribuir el agar inoculado uniformemente sobre la superficie. Colocar 6 cilindros en cada placa de modo que se encuentren aproximadamente a intervalos de 60°C y a 2.8 cm. de radio.

h) Procedimiento

Usar un total de doce placas, 3 para cada dilución excepto la solución de referencia, la cual deberá ser - incluída en cada placa. En cada una de 3 placas llenar alternativamente 3 cilindros con el patrón de referencia (0.1 mcg/ml) y los otros 3 cilindros con la concentración de 0.64 mcg/ml; en las siguientes 3 - placas llenar 3 cilindros con la solución de referencia (0.1 mcg/ml) y 3 cilindros con la dilución 0.08 - mcg/ml y así sucesivamente.

Para la muestra por probar, usar 3 placas; llenar -- alternativamente 3 cilindros con la dilución del pa-- trón de referencia y los otros 3 cilindros con la di- lución de la muestra (0.1 mcg/ml. estimativa), colo - car cuidadosamente las placas en charolas e incubar - de 16 a 18 horas a 32-35°C.

Después de la incubación, medir el diámetro de las zonas de inhibición.

i) Estimación de potencia

Preparar la curva patrón, promediando el diámetro de cada una de las concentraciones de la solución patrón. Promediar los 36 diámetros de la concentración de referencia (0.1 mcg/ml). El promedio de los 36 diáme - tros de las concentraciones de referencia es el punto de corrección para la curva.

a = promedio de los diámetros de las zonas de inhibi-

ción de las concentraciones de 0.064 mcg/ml.

b = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 0.08 mcg/ml.

c = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 0.1 mcg/ml.

d = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 0.125 mcg/ml.

e = promedio de los diámetros de las zonas de inhibición de las concentraciones de 0.156 mcg/ml.

Teniendo los promedios de las zonas de inhibición de todas las concentraciones, calcular según la siguiente ecuación:

$$L = \frac{3a + 2b + c - 3}{5}$$

$$H = \frac{3c + 2d + e - 3}{5}$$

Donde:

L = diámetro en mm. de la zona de inhibición de la concentración más baja.

H = diámetro en mm. de la zona de inhibición de la concentración más alta.

En papel semilogarítmico, marcar la concentración del antibiótico en mcg/ml, en las ordenadas y el diámetro de -

las zonas de inhibición en las abscisas. Trazar la curva - usando los valores encontrados de L y H. Interpolar en la - curva para encontrar la lectura en mm. que deberá dar la - concentración de referencia (0.1 mcg/ml).

Para determinar la potencia de la muestra, promediar los diámetros de las zonas de inhibición del patrón de referencia y los diámetros de las zonas de inhibición de la - muestra de las tres placas usadas. Si el promedio del diámetro de las zonas del patrón de referencia, es mayor que - la lectura corregida en la curva, para esa misma concentración, la diferencia entre los dos es restada a la lectura - promedio de la muestra; si por lo contrario, el promedio - del diámetro de las zonas del patrón de referencia es menor que el encontrado, para esa misma concentración en la curva, la diferencia entre las dos es sumada al promedio encontrado en las zonas de la muestra.

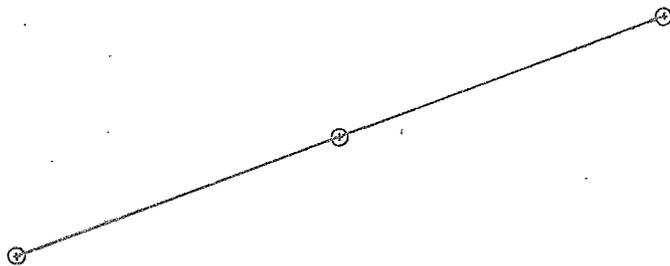
Leer en la curva, la concentración correspondiente al valor corregido de los diámetros de la muestra.

Multiplicar la concentración encontrada, por la dilución efectuada para obtener el contenido total de la muestra - tra.

mcg/ml

56

EJEMPLO DE CURVA PATRON PARA DETERMINACION DE POTENCIA DE
HETACILINA



17

18

19

20

21 mm

2. METODOS QUIMICOS

2.1 Método químico con solución cúprica

La Hetacilina es transformada por hidrólisis a ampicilina, por disolución en metanol, en un tiempo aproximado de sesenta minutos y posteriormente es analizada como ácido - ampicilínico.

A) Reactivos y soluciones

a) Solución buffer pH 5.2

Pesar 15.22 gramos de fosfato dibásico de sodio, co--locarlo en un matraz aforado de 1.0 litro, disolver - en suficiente agua destilada y aforar, de esta solul-ción tomar 536 ml y agregar 464 ml de una solución de ácido cítrico 0.1 M, controlar el pH por medio de unpotenciómetro y si es necesario corregir las dos solul-ciones para obtener el pH deseado.

b) Solución cúprica

3.920 gramos de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, son disueltos en agua desl-tilada, aforando después a 1 litro con agua destilada.

c) Solución reactivo

Agregar 15 ml de solución cúprica a 985 ml de la solul-ción buffer pH 5.2.

B) Procedimiento

a) Preparación de la muestra

Disolver aproximadamente 60 mg de muestra exactamente pesada, en un matraz volumétrico de 100 ml con 20 ml de metanol. Guardar la solución protegiéndola de la luz durante una hora, aforar con agua destilada y transferir 2 ml de esta solución a un matraz volumétrico de 50 ml. Aforar con la solución reactivo, transferir 10 ml. de esta última solución a tubos de ensayo y colocarlos en baño de agua a 75°C durante 30 minutos. Leer en el espectrofotómetro a 320 μ , usando la solución no calentada como blanco.

b) Preparación de la solución patrón de referencia

Transferir aproximadamente 50 mg de Ampicilina trihidratada de valoración conocida como patrón de referencia, a un matraz volumétrico de 100 ml. y disolver con agua destilada. Una vez disuelto aforar a ese volumen con agua destilada, transferir 1.0, 1.5, 2.0, y 2.5 ml. a cuatro matraces de 100 ml. respectivamente.

Leer los valores en absorbancia de 320 μ usando la solución no calentada como blanco. Trazar en una gráfica los valores obtenidos para cada una de las diluciones del patrón de referencia, en el eje de las or-

denadas y las concentraciones en el eje de las abscisas. Leer la concentración del problema a partir de la línea de respuesta trazada en la gráfica.

c) Cálculos

$$\frac{C \times D \times 1.11}{\text{Peso de muestra en mg}} \times 100 = \text{Por ciento de Hetacilina}$$

Donde:

C = concentración de la muestra en mg de Hetacilina -
-por ml. obtenida en la gráfica.

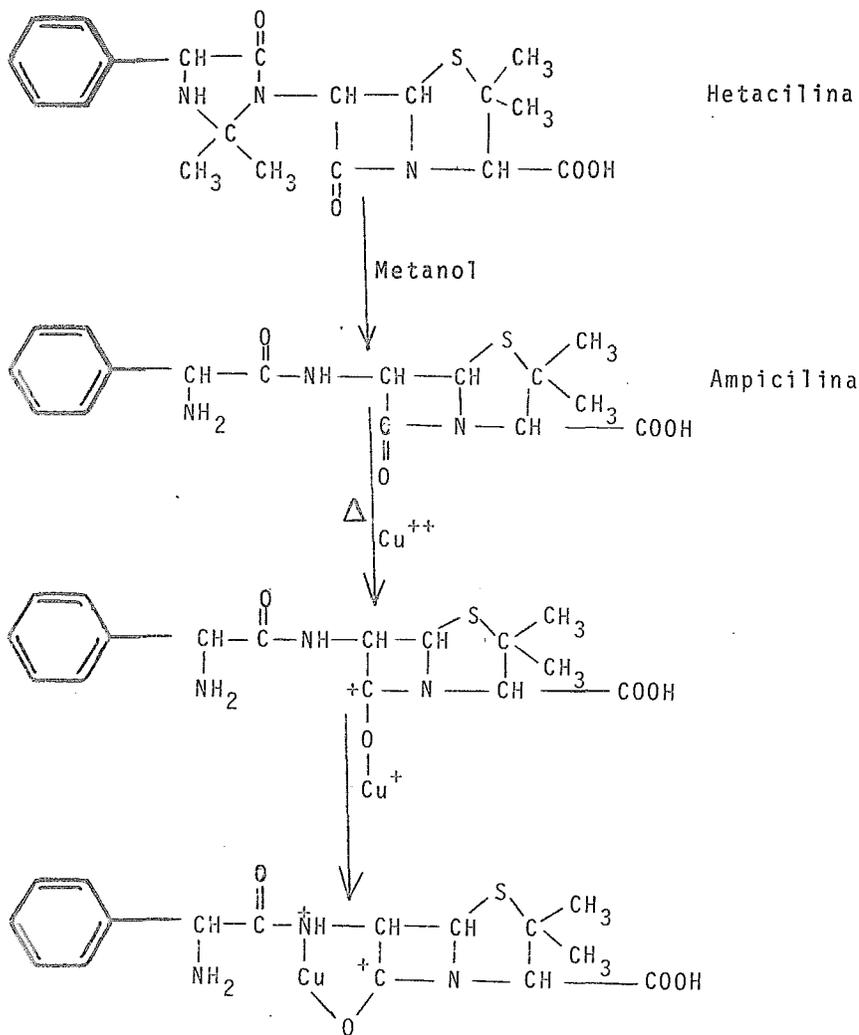
D = factor de dilución

1.11 = factor de conversión de Ampicilina a Hetacilina

$$\text{Factor de conversión} = \frac{\text{Peso molecular de Hetacilina}}{\text{Peso molecular de Ampicilina}}$$

$$= \frac{389.48}{349.4} = 1.11$$

REACCION DE HETACILINA CON SULFATO
CUPRICO



2.2 Método químico. Yodométrico

El objetivo es valorar Hetacilina, al determinar la cantidad de yodo consumido por la Hetacilina inactivada.

A) Reactivos y soluciones

- a) Solución buffer de fosfatos al 1% y pH = 6.0
- b) Alcohol metílico.
- c) Solución de hidróxido de sodio 2 N.
- d) Solución de ácido clorhídrico 2N.
- e) Solución buffer de biftalato de potasio.
- f) Solución valorada de yodo 0.01N.
- g) Solución valorada de tiosulfato de sodio 0.01N.
- h) Solución indicadora de almidón.

B) Procedimiento

- a) Preparación de la solución patrón de referencia
Transferir 50 mg, cuidadosamente pesados, de Hetacilina de valoración conocida como patrón de referencia, a un matraz volumétrico de 25 ml. Agregar 10 ml. de alcohol metílico. Agitar hasta completa disolución y dejar reposar en la oscuridad durante una hora, aforar después a 25 ml. con solución buffer de fosfatos.
- b) Preparación de la muestra

Agregar 50 mg de la muestra, cuidadosamente pesada, a un matraz volumétrico de 25 ml. Agregar 10 ml. de al co h o l m e t i l i c o. Agitar hasta completa disolución de la muestra y dejar reposar en la oscuridad durante - una hora, aforar después con solución buffer de fosfa t o s.

Efectuar lo siguiente tanto para la solución del pa t r o n de referencia como para la solución de la mues t r a:
tra:

Llevar 2 ml de las soluciones resultantes, respectiva m e n t e a 2 matraces de yodo de 100 ml, marcados como a y b para el patrón de referencia y a ', b ' para la - muestra. A los matraces a y a ' agregar 2 ml. de NaOH 2N, taparlos y dejar reposar en la oscuridad a tempe r a t u r a ambiente durante 30 minutos. Después agregar s u c e s i v a m e n t e 2 ml. de HCL 2 N, 5 ml. de buffer de - biftalato de potasio pH 4.5 y 20 ml de yodo 0.01 N. - Tapar los matraces y dejarlos reposar durante 20 minu t o s. Titular el exceso de yodo con tiosulfato de so d i o 0.01N, usando solución de almidón como indicador. A los matraces b y b', usados como blancos, agregar - 5 ml de la solución buffer de biftalato de potasio, - 20 ml de yodo y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0.01 N.

C) Cálculos

$$\frac{A \times C \times E}{B \times D \times F} \times 100 = \text{Por ciento de Hetacilina}$$

Donde:

A = ml de yodo consumidos por la muestra en la titulación.

B = ml de yodo consumidos por el patrón de referencia en la titulación.

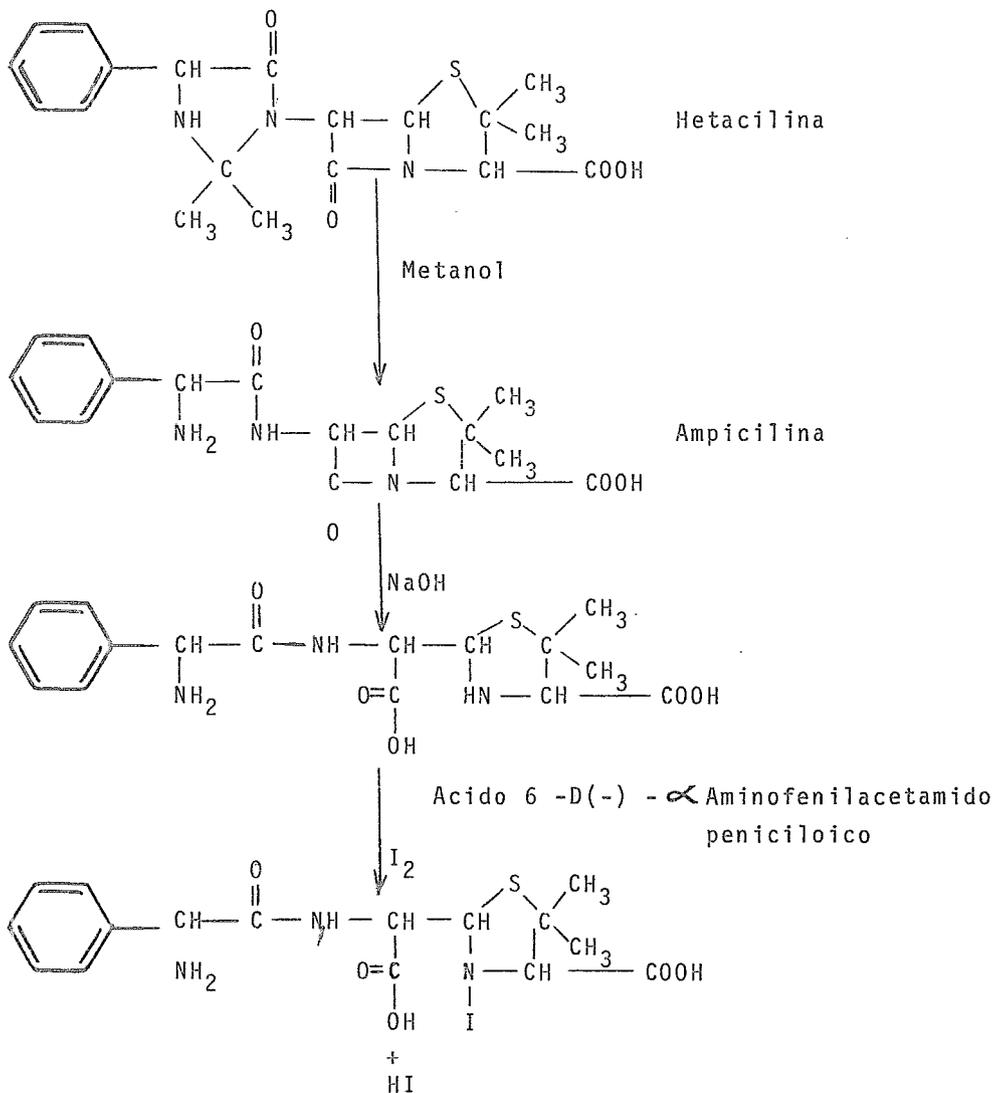
C = potencia en mcg contenida en los ml. titulados - del patrón de referencia.

D = ml titulados del patrón de referencia.

E = factor de dilución.

F = peso de la muestra.

REACCION DE HETACILINA POR METODO
YODOMETRICO



2.3 Método químico con p-dimetil amino cinnamaldehido

El objetivo es la determinación de Hetacilina directamente con el método colorimétrico, usando como reactivo el p-dimetil amino cinnamaldehido.

A) Reactivos y soluciones

a) Solución de ácido clorhídrico-acetona

Diluir 8.5 ml de ácido clorhídrico concentrado a 1 litro con acetona y mezclar bien. Usarla un día solamente.

b) Solución de p-dimetil amino cinnamaldehido

Disolver 0.5 g. de p-dimetil amino cinnamaldehido en solución suficiente de ácido clorhídrico-acetona, aferrar a un volumen final de 100 ml. y agitar, bien, filtrarse si es necesario. Esta solución debe ser preparada poco antes de usarla.

B) Procedimiento

a) Preparación de las soluciones del patrón de referencia

Transferir aproximadamente 100 mg de Hetacilina patrón de referencia, cuidadosamente pesados y llevar--

los a un matraz volumétrico de 200 ml. Agregar 150 - ml. de agua destilada y refrigerada y 20 ml. de ácido clorhídrico 1N, agitar y aforar a 200 ml. con agua - destilada y mezclar bien. Transferir 0.5, 1.0 y 2.0- ml. a tres matraces de 25 ml. respectivamente. Agre- gar 1.5 y 1.0 ml. de ácido clorhídrico al primero y - al segundo, de los tres matraces respectivamente, lle var a un volumen de 2.0 ml. cada uno.

b) Preparación de las soluciones de la muestra

Usar un mortero para moler hasta pulverizar la mues - tra a tener un polvo fino. Transferir aproximadamen - te 100 mg. de muestra cuidadosamente pesados a un ma - traz volumétrico de 200 ml. Agregar 150 ml. de agua - destilada y refrigerada y 20 ml. de ácido clorhídri - co 1N, agitar, aforar con agua destilada y mezclar - bien, transferir 1.0 ml. a un matraz volumétrico de - 25 ml., agregar 1.0 ml. de ácido clorhídrico 0.1N y - mezclar.

c) Preparación del blanco

Transferir 2.0 ml. de ácido clorhídrico 0.1N a un ma - traz de 25 ml. y efectuar lo siguiente:

A cada uno de los matraces conteniendo patrón de refe - rencia, blanco y muestra, agregar 15 ml. de la solu - ción de ácido clorhídrico-acetona y mezclar. Agregar

3 ml. de la solución de p-dimetil amino cinnamaldehído a cada uno y mezclar. Agregar 3 ml. de ácido clorhídrico 0.1N, aforar con la solución ácido clorhídrico-acetona, mezclar bien y dejar reposar a 25°C durante 30 minutos exactamente. Filtrar las soluciones de la muestra si es necesario para eliminar cualquier turbidez. Usando un espectrofotómetro, leer los valores en absorbancia de las soluciones del patrón de referencia y de la muestra a una longitud de onda de 515 $m\mu$ contra el blanco. Trazar en una gráfica los valores obtenidos para cada una de las diluciones del patrón de referencia en el eje de las ordenadas y las concentraciones en el eje de las abscisas. Leer la concentración de la muestra a partir de la línea de respuesta trazada en la gráfica.

C) Cálculos

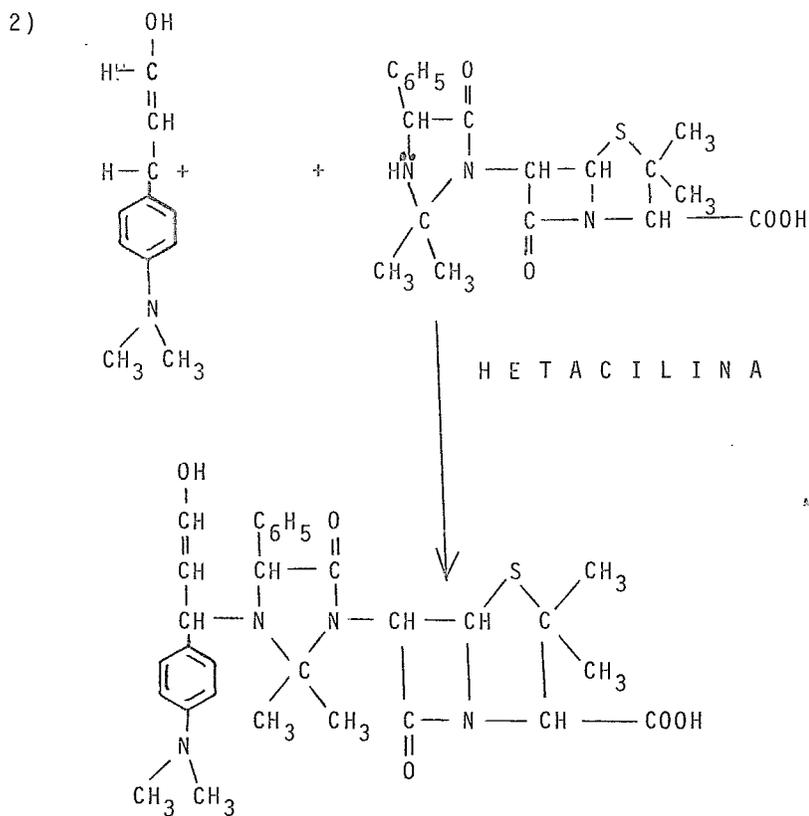
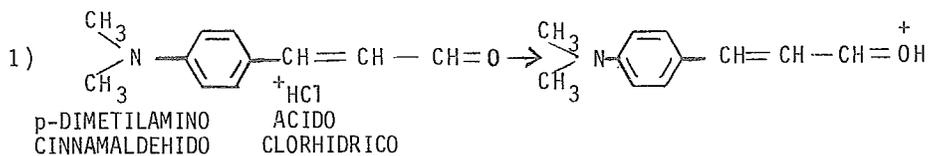
$$\text{Por ciento de Hetacilina} = \frac{C \times 5000}{\text{Peso de la muestra en mg.}} \times 100$$

Donde:

C = concentración de la muestra en miligramos de Hetacilina por mililitro, obtenida en la gráfica.

5000 = factor de dilución.

REACCION DE HETACILINA CON
CINNAMALDEHIDO



2.4 Método químico ácido-base con ácido perclórico

El objetivo es la determinación de los grupos amino - existentes en la Hetacilina y llevar a cabo su cuantifica - ción.

A) Reactivos y soluciones

- a) Acido acético glacial
- b) Acido perclórico 0.1 N
- c) Solución indicadora de cristal violeta al 1.0% en - ácido acético.

B) Procedimiento

Agregar 500 mg. de muestra exactamente pesada, a un - matraz Erlenmeyer.

Agregar 100 ml. de ácido acético glacial neutralizado con ácido perclórico 0.1N, usando cristal violeta co - mo indicador y calentar hasta que la muestra quede com - pletamente en solución.

Titular con ácido perclórico 0.1N.

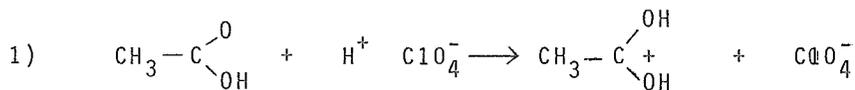
C) Cálculos

$$1 \text{ ml. de } \text{HClO}_4 \text{ 0.1N} = 19.47 \text{ mg. de Hetacilina}$$

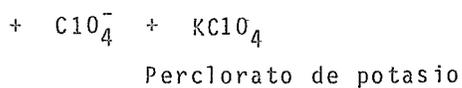
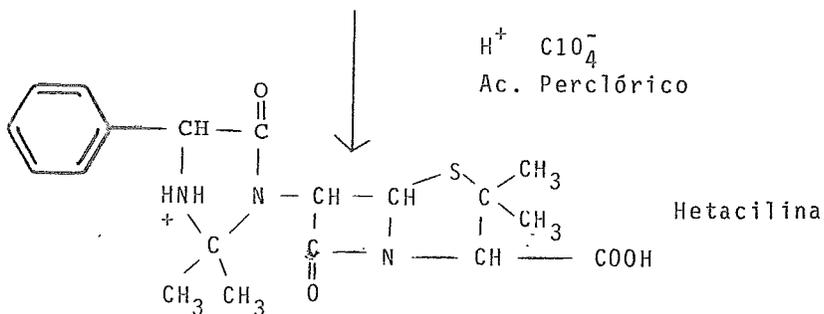
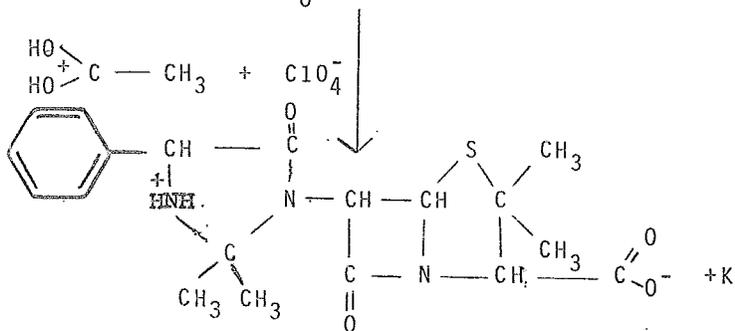
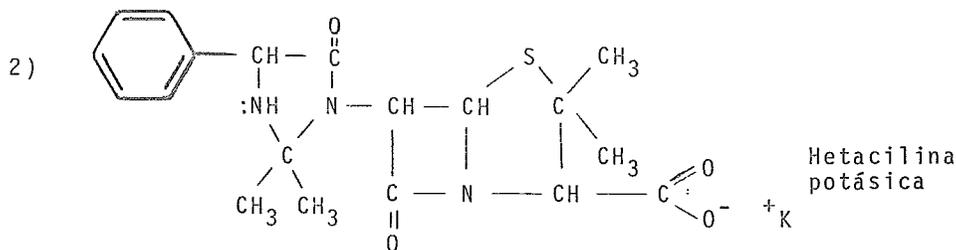
(Para Hetacilina Potásica)

$$\frac{\text{Mililitros de HClO}_4 \text{ gastados} \times 19.47}{\text{Peso de la muestra en mg.}} = \text{mcg de Hetacilina/mg}$$

REACCION DE HETACILINA POTASICA CON ACIDO
PERCLORICO



Acido acético Acido perclórico



ESTUDIO ESTADISTICO

ESTUDIO ESTADISTICO

Del estudio realizado, se llevaron a cabo determinaciones cuantitativas en materia prima y algunas formas farmacéuticas (cápsulas, inyectables y granulado para solución oral).

Se efectuó una comparación entre dos métodos microbiológicos y cuatro métodos químicos.

Con los resultados obtenidos en las diferentes valoraciones, se realizó el análisis estadístico tomando en cuenta los siguientes parámetros:

- a) Media aritmética (\bar{X})
- b) Desviación estándar (S)
- c) Coeficiente de variación (c.v.)
- d) Error estándar (e)
- e) Prueba de significación, "t" de Student, para pequeñas muestras.

VALORES OBTENIDOS PARA MATERIA PRIMA
 POR METODO MICROBIOLÓGICO CON S. AUREUS

	X (mcg/mg)	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²	
1	972	46.21	2135	\bar{X} = 925.79
2	969	43.21	1867	S = 27.76
3	965	39.21	1537	c.v. = 3.0
4	936	10.21	104	e = 7.4
5	932	6.21	39	t = 2.16
6	928	2.21	4.9	lím. fid. = 925.79 ± 7.4 x 2.16
7	925	0.79	0.62	= 925.79 ± 15.98 = $\begin{cases} 941.77 \\ 909.81 \end{cases}$
8	925	0.79	0.62	
9	914	11.79	139	
10	910	15.79	249	
11	910	15.79	249	
12	903	22.79	519	
13	888	37.79	1428	
14	884	41.79	1746	
	<u> </u>		<u> </u>	
	= 12961		10018.14	

VALORES OBTENIDOS PARA MATERIA PRIMA POR METODO
MICROBIOLOGICO CON S. LUTEA

	X (mcg/mg)	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²	
1	945	41.08	1688	\bar{X} = 903.92
2	940	36.08	1302	S = 30.34
3	936	32.08	1029	c.v. = 3.36
4	931	27.08	733	e = 8.76
5	917	13.08	171	t = 2.2
6	912	8.08	65.3	
7	899	4.92	24.2	
8	890	13.92	194	
9	876	27.92	780	
10	872	31.92	1019	
11	867	36.92	1363	
12	862	41.92	1757	
	<u>10847</u>		<u>10125.5</u>	1 ím. fid. = 903.92 ± 8.76 × 2.2
				= 903.92 ± 19.27 = $\begin{matrix} 923.19 \\ 884.65 \end{matrix}$

VALORES OBTENIDOS PARA MATERIA PRIMA POR METODO
QUIMICO CON SULFATO CUPRICO

	X (mcg/mg)	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²
1	929	37.94	1439
2	917	25.94	673
3	906	14.94	223
4	906	14.94	223
5	900	8.94	80
6	894	2.94	8.6
7	894	2.94	8.6
8	894	2.94	8.6
9	887	4.06	17
10	887	4.06	17
11	887	4.06	17
12	883	8.06	65
13	871	20.06	402
14	871	20.06	402
15	871	20.06	402
16	860	31.06	965
	<u> </u>		<u> </u>
	= 14257		.4950.8

$$\bar{X} = 891.06$$

$$S = 18.16$$

$$c.v. = 2.03$$

$$e = 4.54$$

$$t = 2.13$$

$$\text{lím. fid.} = 891.06 \pm 4.54 \times 2.13$$

$$= 891.06 \pm 9.67 = \begin{matrix} 900 \\ 881.4 \end{matrix}$$

VALORES OBTENIDOS PARA MATERIA PRIMA POR METODO
QUIMICO YODOMETRICO

	X (mcg/mg)	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²	
1	930	30.5	930	$\bar{X} = 899.5$
2	924	24.5	600	S = 20.87
3	907	7.5	56	c.v. = 2.32
4	905	5.5	30	e = 6.6
5	904	4.5	20	t = 2.26
6	900	0.5	0.25	
7	900	0.5	0.25	
8	890	9.5	90	
9	876	23.5	552	
10	<u>859</u>	40.5	<u>1640</u>	
	= 8995		3918.5	lím. fid. = 899.5 ± 6.6 x 2.26
				= 899.5 ± 14.9 = $\begin{cases} 914.4 \\ 884.6 \end{cases}$

VALORES OBTENIDOS PARA MATERIA PRIMA POR METODO QUIMICO CON
CINNAMALDEHIDO

	X (mcg/mg)	(X - \bar{X})	(X - \bar{X}) ²	
				\bar{X} = 894.29
1	941	46.71	2181.8	S = 24.62
2	915	20.71	428.9	c.v. = 2.75
3	915	20.71	428.9	e = 6.58
4	915	20.71	428.9	t = 2.16
5	915	20.71	428.9	
6	915	20.71	428.9	
7	892	2.29	5.2	
8	892	2.29	5.2	
9	870	24.29	590	
10	870	24.29	590	
11	870	24.29	590	
12	870	24.29	590	
13	870	24.29	590	
14	870	24.29	590	
	= 12520		7876.7	lím. fid. = 894.29 ± 6.58 x 2.16
				= 8924.29 ± 14.21 = $\begin{cases} 908.5 \\ 880.0 \end{cases}$

VALORES OBTENIDOS PARA MATERIA PRIMA POR METODO QUIMICO
CON AC. PERCLORICO

	x (mcg/mg)	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²	
				\bar{x} = 891.7
				S = 5.79
				c.v. = 0.65
				e = 1.29
				t = 2.09
				lím fid. = 891.7 ± 1.29 × 2.09
				= 891.7 ± 2.7 = $\begin{cases} 894.4 \\ 889 \end{cases}$
1	903	11.3	128	
2	903	11.3	128	
3	896	4.3	19	
4	896	4.3	19	
5	896	4.3	19	
6	896	4.3	19	
7	896	4.3	19	
8	892	0.3	0.09	
9	892	0.3	0.09	
10	892	0.3	0.09	
11	892	0.3	0.09	
12	888	3.7	14	
13	888	3.7	14	
14	888	3.7	14	
15	888	3.7	14	
16	888	3.7	14	
17	888	3.7	14	
18	886	5.7	33	
19	886	5.7	33	
20	<u>880</u>	11.7	<u>137</u>	
	= 17834		638.36	

VALORES OBTENIDOS AL EFECTUAR EL ANALISIS COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES
METODOS PARA MATERIA PRIMA

METODOS	PARAMETROS				VALOR DE "t" CALCULADO					
	\bar{x}	S	c.v.	e	S.LUTEA	S.AUREUS	YODOM.	SULFATO CUPRICO	CINNAM.	ACIDO PERCLOR.
S. LUTEA	903.02	30.34	3.36	8.76	-	1.92	-	-	-	-
S. AUREUS	925.79	27.26	3.0	7.4	1.92	-	-	4.099	-	-
METODOS										
QUIMICOS										
YODOMETRICO	899.5	20.87	2.32	6.6	-	-	-	1.09	-	-
SULFATO CUPRICO	891.06	18.16	2.03	4.54	-	4.099	1.09	-	-	-
CINNAMALDEHIDO	894.29	24.62	2.75	6.58	-	-	-	-	-	0.498
ACIDO PERCLORICO	891.7	5.79	0.65	1.29	-	-	-	-	0.498	- 08

METODO MICROBIOLOGICO DE DIFUSION EN PLACA CON DISCOS DE PA
PEL (UTILIZANDO S. AUREUS COMO MICROORGANISMO DE PRUEBA)

FORMA FARMACEUTICA	No. de LOTE	RESULTADOS (mcg/mg)
Cápsulas	1	880.8
	2	858.4
	3	806.8
	4	804.8
	5	792.6
	6	787.8
Inyectables	7	892.5
	8	883.2
	9	880.1
	10	879
	11	838.4
	12	806.3
	13	775.3
Granulado para solución oral	14	340
	15	337.5
	16	332.5
	17	320
	18	316.2

METODO DE DIFUSION EN PLACA CON CILINDROS DE ACERO INOXIDABLE (UTILIZANDO S. LUTEA COMO MICROORGANISMO DE PRUEBA)

FORMA FARMACEUTICA	NO. DE LOTE	RESULTADOS (mcg/mg)
Cápsulas	1	871.3
	2	870.9
	3	828.1
	4	796.8
	5	788.3
	6	777
Inyectables	7	912.1
	8	893.8
	9	869.8
	10	866.3
	11	864.4
	12	838.4
	13	756.3
Granulado para solución oral	14	335
	15	328
	16	316.2
	17	315

METODO QUIMICO CON SULFATO CUPRICO

FORMA FARMACEUTICA	NO. DE LOTE	RESULTADOS (mcg/mg)
Cápsulas	1	891.8
	2	834
	3	830.7
	4	817
	5	775
	6	718
Inyectables	7	888.3
	8	875.8
	9	859
	10	833.6
	11	823
	12	791
	13	775.8
Granulado para solución oral	14	357.5
	15	335
	16	325
	17	318.8
	18	310

METODO QUIMICO, YODOMETRICO

FORMA FARMACEUTICA	NO. DE LOTE	RESULTADOS (mcg/mg)
Cápsulas	1	902.4
	2	858
	3	856.9
	4	841.7
	5	836
	6	797
Inyectables	7	883.8
	8	878
	9	878
	10	876.8
	11	865
	12	865
	13	864.9
Granulado para solución oral	14	362.5
	15	358.8
	16	340
	17	340
	18	328.8

METODO QUIMICO CON p-DIMETIL-AMINO-CINNAMALDEHIDO

FORMA FARMACEUTICA	NO. DE LOTE	RESULTADOS (mcg/mg)
Cápsulas	1	857
	2	795.3
	3	787
	4	780
	5	730
	6	706.2
Inyectables	7	937
	8	883.8
	9	862.5
	10	832.5
	11	819
	12	818.6
	13	774
Granulado para solución oral	14	386
	15	357.5
	16	355
	17	348.8
	18	340

METODO QUIMICO CON ACIDO PERCLORICO

FORMA FARMACEUTICA	NO. DE LOTE	RESULTADOS (mcg/mg)
Cápsulas	1	872
	2	864
	3	860.0
	4	855.9
	5	833
	6	798.3
Inyectables	7	881.9
	8	880
	9	876
	10	876
	11	870.7
	12	860
	13	850
Granulado para solución oral	14	580
	15	573.8
	16	556
	17	556
	18	545

VALORES OBTENIDOS AL EFECTUAR EL ANALISIS COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES METODOS PARA CAPSULAS

METODOS	PARAMETROS				VALOR DE "t" CALCULADO					
	\bar{x}	S	c.v.	e	S.LUTEA	S.AUREUS	YODOM.	SULFATO CUPRICO	CINNAM.	ACIDO PERCLOR.
MICROBIOLOGICOS										
S. LUTEA	822.06	41.60	5.06	16.98	-	0.0086	1.2067	0.3725	1.6772	1.2411
S. AUREUS	821.86	38.32	4.66	15.64	0.0086	-	1.2745	0.3752	1.7203	1.3229
METODOS										
QUIMICOS										
YODOMETRICO	848.66	34.41	4.05	14.0	1.2067	1.2745	-	1.3472	2.8190	0.0761
SULFATO CUPRICO	811.08	59.03	7.28	24.1	0.3725	0.3752	1.3472	-	1.0855	1.3632
CINNAMALDEHIDO	775.91	53.02	6.8	21.64	1.6772	1.7203	2.8190	1.0855	-	2.9302
ACIDO PERCLORICO	847.30	27.36	3.23	11.17	1.2411	1.3229	0.0761	1.3632	2.9302	- 87

VALORES OBTENIDOS AL EFECTUAR EL ANALISIS COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES METODOS
PARA GRANULADO PARA SOL. ORAL

M E T O D O S	P A R A M E T R O S				V A L O R D E "t" C A L C U L A D O					
	\bar{X}	S	c.v.	e	S.LUTEA	S.AUREUS	YODOM.	SULFATO CUPRICO	CINNAM.	ACIDO PERCLOR.
S. LUTEA	322.84	8.48	2.63	3.8	-	1.0534	3.1319	1.7432	4.0129	34.26
S. AUREUS	329.24	10.60	3.22	4.74	1.0534	-	2.1191	0.0021	3.1064	30.84
METODOS										
QUIMICOS										
YODOMETRICO	346.02	14.17	4.1	6.33	3.1369	2.1191	-	1.6229	1.1427	24.93
SULFATO CUPRICO	322.84	8.49	2.62	3.8	1.7432	0.0021	1.6229	-	2.5075	23.08
CINNAMALDEHIDO	357.46	17.32	4.85	7.75	4.0129	3.1064	1.1427	2.5075	-	20.95
ACIDO PERCLORICO	560.16	12.95	2.3	5.8	34.26	30.83	24.93	23.08	20.95	- 88

VALORES OBTENIDOS AL EFECTUAR EL ANALISIS COMPARATIVO DE LOS DIFERENTES METODOS PARA
INYECTABLES

M E T O D O S	P A R A M E T R O S				V A L O R D E "t" C A L C U L A D O					
	\bar{X}	S	c.v.	e	S.LUTEA	S.AUREUS	YODOM.	SULFATO CUPRICO	CINNAM.	ACIDO PERCLOR.
S. LUTEA	857.3	50.30	5.87	19.0	-	0.2523	0.8195	0.8902	0.3812	0.6845
S. AUREUS	864.37	54.45	6.3	20.58	0.2523	-	0.4183	1.1201	0.6130	0.4741
METODOS										
QUIMICOS										
YODOMETRICO	837.07	7.9	0.9	2.99	0.8195	0.4183	-	2.3347	1.2996	0.4543
SULFATO CUPRICO	835.21	42.16	5.05	15.93	0.8902	1.1201	2.3347	-	0.4550	0.2143
CINNAMALDEHIDO	846.77	52.95	6.25	20.01	0.3814	0.6130	1.2996	0.4550	-	1.1656
ACIDO PERCLORICO	870.65	11.62	1.33	4.39	0.6845	0.4741	0.4543	2.1438	1.1656	- 08

C O N C L U S I O N E S

C O N C L U S I O N E S

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas efectuadas se concluyó que:

1. El método microbiológico para la valoración de Hetacilina permite determinar la actividad del antibiótico por inhibición del desarrollo de un microorganismo vivo, sensible al compuesto.
2. Se efectuaron valoraciones con dos microorganismos de prueba, *S. lutea* y *S. aureus* y el estudio estadístico muestra diferencias no significativas entre un método y otro.
3. Los métodos microbiológicos presentan inconvenientes en relación con los métodos químicos por requerir mayor tiempo, material y el mantenimiento adecuado de microorganismos de prueba y de los medios de cultivo-

necesarios.

4. El método por reacción con sulfato de cobre puede considerarse como el método químico más adecuado para la valoración de Hetacilina, debido a la estabilidad de la reacción y la constante reproducibilidad de las lecturas espectrofotométricas.

Debe tenerse en cuenta al efectuarse la valoración por este método, el mantener constantes las condiciones de temperatura, pH y tiempo de reacción.

Este método puede considerarse confiable para determinar la actividad del antibiótico, ya que en la reac-ción se encuentra involucrado el anillo beta lactámico.

5. El método yodométrico es el método químico más usual en la valoración de antibióticos beta lactámicos, por lo cual es aplicable en la valoración de Hetacilina, teniendo los inconvenientes que presenta una reacción por titulación, en cuanto a manipulación para la de-terminación del punto final y mantener constantes las condiciones para efectuarla.

Es un método confiable para medir la actividad del an

tibiótico al determinar la cantidad de yodo consumido por la Hetacilina inactivada.

6. En el análisis estadístico se encontraron diferencias no significativas entre el método por reacción con sulfato de cobre y el método yodométrico.
7. El método por titulación con ácido perclórico se considera un método poco confiable, por la dificultad que presenta la captación del punto final al efectuar la titulación, siendo variable el gasto del ácido titulante, trayendo como consecuencia aumentos considerables en la valoración de la muestra al incrementarse el volumen del ácido.

Este método no permite valorar la actividad del antibiótico, únicamente determina los grupos funcionales-amino existentes. Por otro lado, permite cuantificar dichos grupos funcionales en materia prima, existiendo interferencia en las diversas formas farmacéuticas por los excipientes agregados.

8. El método por reacción con cinnamaldehído es un método no confiable, debido a la inestabilidad de la reacción con Hetacilina y la dificultad que esto reprenta al efectuar las lecturas espectrofotométricas.

Este método no permite la valoración de actividad del antibiótico debido a que la reacción se lleva a cabo entre el cinnamaldehído y el grupo amino presente.

9. En el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas entre el método por reacción con cinnamaldehído y el método por titulación con ácido--perclórico.
10. Al efectuarse el análisis comparativo entre métodos--químicos y microbiológicos se encontraron diferencias significativas.

B I B L I O G R A F I A

B I B L I O G R A F I A

1. Ama Drug Evaluations
Segunda Edición
Publishing Sciences Group, Inc.
Acton, Massachusetts
1973
2. Azimi P.H., Cramplett H.G., Clinical and laboratory studies of hetacillin in infants and children. Anti microbial Agents and Chemoterapy 1966. 114-117.
3. Breed S. Robert
Bergey's Manual of Determinative Bacteriology
Séptima edición
The Williams and Wilkins Co.
Baltimore
1967.
4. Brock Thomas
Biology of Microorganisms
Segunda edición
Prentice Hall
New Jersey
1974.
5. Bunn P.A., Milicich S., Lunn J.S. Pharmacological pro perties of hetacillin in the human. Anti microbial Agents and Chemoterapy 1965, 947.

6. Burdon K.L. and Williams R.P. Microbiología Primera edición en español México, 1971.
7. Code of Federal Regulations Food and Drugs (1976)
8. De Felice E.A., Mehta D.J., Cahn M.M., Levy E.J. Evaluation of safety, serum levels and urinary excretion of hetacillin in normal volunteers. Toxicology and Applied Pharmacology 1967, 11, 20-25.
9. De Ritis F., Scioli Treatment of biliary infections - with ampicillin and hetacillin. Chemotherapy 1968, 13, 42-53.
10. Federal Register, Vol. 35, No. 245-December 18, 1970
11. Hardcastle G.A., Jr., Johnson D.A., Panetta C.A. The preparation and SUructure of Hetacillin. Journal of Organic Chemistry 1966, 31, 897.
12. Hoffauir, C.W., Sandstrom S.M., Smith M.H.D. A consideration of special problems in infections of new - borns and small children. Annals New York Academy - of Sciences 1967, 145, 393-401.
13. Hogan L.B., Holloway W.J., Scott E.G. Clinical experience with hetacillin. Current Therapeutic Research 1968, 10, 363-372.
14. Howard J.E., Beca J.P. Clinical assessment of hetacillin in acute diarrhea of malnourished infants. Annals New York Academy of Sciences 1967, 145, 436-441.
15. Kirby W.M., M., Kind A.C. Clinical Pharmacology of - ampicillin and hetacillin. Annals New York Academy - of Sciencies 1967, 145, 291-297.

16. Louria D.B., Schultz M. Treatment of pneumonia in adults with hetacillin. Annals New York Academy of Sciences 1967, 145, 387-390.
17. Magni L. Ortengren B., Sjoberg B., Wahlquist S. Stability, absorption and excretion studies with hetacillin. Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation 1967, 20, 195-301.
18. Page M.I. Clinical studies with hetacillin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1966, 107-113.
19. Pelczar
Microbiology
Segunda edición
Mc Graw Hill
New York
1972.
20. Razzi A. Impiego clinico di un nuovo derivato dell'acido 6-aminopenicillanico (Hetacillin). Minerva Pediatrica 1967, 19, 420-424.
21. Remington's Pharmaceutical Sciences
Décimo cuarta edición
Mach Publishing Co.
Easton, Pennsylvania
1970.
22. Scioli C., Giusti C. Hetacillin in the treatment of typhoid fever. Clinical Medicine 1967, 74, 68-70.
23. Smith M.H.D., Sandstrom S.M., Hoffauir C.W. Preliminary evaluation of hetacillin in the treatment of acute bacterial meningitis. Annals New York Academy of Sciences 1967, 115, 502-504.
24. Sutherland R., Robinson, O.P.W. Laboratory and pharmacological studies in man with hetacillin and ampicillin. British Medical Journal 1967, 2, 804-808.
25. The Merck Index
Novena edición

Merck Co., Inc.
Rahway, N.J., U.S.A.
1976

26. The United States Dispensatory
Osol Pratt
J.B. Lippincot Co.
Philadelphia, Toronto
1973
27. Tuano, S.B., Johnson, L.D., Prodie, J.L., Kirby W.M.M.
Comparative blood levels of hetacillin, ampicillin -
and penicillin G. New Eng. J. Med. 1966, 275, 635- -
639.
28. Wilson Charles O.
Textboox of organic, medicinal and pharmaceutical che
mistry.
Sexta edición
J.B. Lippincott Co.
Philadelphia. Toronto.
1971.