



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## ESTUDIO CITOTOXICOLOGICO DE LA AMPICILINA.

T E S I S

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :  
CARLOS IGNACIO OTERO ICAZA



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

LIBRADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TITULO

PROF. MANUEL DIEZ DE TRERARRES MORALES

Tesis 1977

NO. ~~1111~~ 315

FECHA \_\_\_\_\_

LIBRO \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



QUIMICA

LIBRO DE CUENTA DE LA FACULTAD DE QUIMICA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
CALLE DE LA QUIMICA S/N  
MEXICO D.F.

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE : PROF. IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA MORA.

VOCAL : PROFA. ETELVINA MEDRANO DE JAIMES.

SECRETARIO : PROF. ENRIQUE CALDERON GARCIA.

1er SUPLENTE : PROFA. ELDA PENICHE QUINTANA.

2do SUPLENTE : PROFA. JOSEFA PIEDRAS ROSS.

Sitio donde se desarrollo el tema:

FACULTAD DE QUIMICA., U.N.A.M.

Nombre completo y firma del sustentante:

CARLOS IGNACIO OTERO ICAZA.

Nombre y firma del asesor del tema:

Q.F.B. ENRIQUE CALDERON GARCIA.

A MIS PADRES  
POR EL CARINO Y COMPRENSION  
QUE ME HAN BRINDADO SIEMPRE

A MIS HERMANOS  
POR SU VALIOSO APOYO MORAL

A MIS AMIGOS  
POR SU ENORME COLABORACION  
Y AFAN DE SUPERACION.

A TODOS MIS MAESTROS CON EL  
CARINO Y RESPETO QUE SE  
MERECEEN.

AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA,  
ESPECIALMENTE A LA SECCION DE  
SERVICIO SOCIAL.

CONTENIDO :

I.- INTRODUCCION.	1
II.- GENERALIDADES.	2
III.- PARTE EXPERIMENTAL.	33
IV.- RESULTADOS.	43
V.- DISCUSION.	45
VI.- BIBLIOGRAFIA.	47

## I.- INTRODUCCION :

El descubrimiento de los antibióticos en el mundo, ha tenido gran importancia para la humanidad, ya que gracias a estas sustancias existe la posibilidad de controlar innumerables infecciones causadas por diversos microorganismos patógenos, que anteriormente producían daños irreparables ó hasta la muerte de seres humanos y animales. Uno de los grupos de antibióticos más importantes es el de las Penicilinas al cual pertenece la Ampicilina, que es un derivado semisintético de gran poder antibacteriano, fácil administración, excelente absorción y excreción, resistente a la degradación y poco tóxico para el organismo, debido a estas características es ampliamente utilizado en nuestro país.

Por desgracia este tipo de sustancias al igual que otros farmacos en México, son utilizados con exageración y descuido, sin tomar en cuenta que además de su acción terapéutica, pueden tener otros efectos sobre el organismo, los cuales dañan la integridad del individuo ejerciendo su actividad tóxica. Por lo consiguiente es necesario estudiar todos los efectos posibles de dichas sustancias sobre el organismo, con el fin de saber si realmente es conveniente su uso como quimioterapicos.

En atención a lo expuesto anteriormente, decidimos realizar un estudio acerca de la Ampicilina, por medio de un ensayo experimental para demostrar la citotóxicidad de este antibiótico, sobre las células sanguíneas especialmente sobre los leucocitos polimorfonucleares.

## II.- GENERALIDADES :

## II.A.- GENERALIDADES SOBRE AMPICILINA.

- A.1.- Formula y Propiedades.
- A.2.- Usos.
- A.3.- Mecanismo de Acción.
- A.4.- Metabolismo.
- A.5.- Toxicidad y Efectos sobre el Organismo.
- A.6.- Determinación.
- A.7.- Destrucción de las Penicilinas.

## II.B.- GENERALIDADES SOBRE FAGOCITOSIS.

- B.1.- Historia.
- B.2.- Celulas Fagocíticas.
- B.3.- Acción Opsónica.
- B.4.- Inmunoglobulinas e Hipersensibilidad.
- B.5.- Quimiotaxis.
- B.6.- Factores que afectan la Fagocitosis  
"In Vitro".
- B.7.- Fagocitosis de Superficie.
- B.8.- Tipos de Fagocitosis.
- B.9.- Mecanismo de la Fagocitosis.
- B.10.- Métodos de Estudio.
- B.11.- Medición de la Actividad Opsónica.
- B.12.- Fagocitosis en la Valoración de Antisépti  
cos y Antibióticos.
- B.13.- Estudios acerca de la Acción de la Ampicilina sobre la Fagocitosis.

## II.A.- GENERALIDADES SOBRE AMPICILINA.

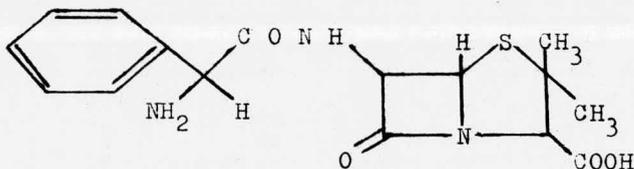
## 1.- Formula y Propiedades :

Ampicilina : D - ( 2 - amino - 2 - fenilacetamido ) - 3,3 - dimetil - 7 - oxo - 4 - tia - 1 - azabicyclo ( 3,2,0 ) heptano - 2 - ácido carboxílico ; 6 - ( D ( - ) -  $\alpha$  - aminofenilacetamido ) ácido penicilánico ; D ( - ) -  $\alpha$  - aminobencilpenicilina.

Es un derivado semisintético, que es producido por diferentes laboratorios industrialmente para su uso terapéutico, a partir del ácido 6 - aminopenicilánico (nucleo molecular de las penicilinas) y el grupo acilo  $\alpha$  aminobencil. ( L1 ).

Formula Condensada :  $C_{16} H_{19} N_3 O_4 S$ .

Formula Desarrollada :



Peso Molecular : 349.42

Análisis Orgánico : C = 55 %

H = 5.48 %

N = 12.02 %

O = 18.32 %

S = 9.18 %

---

Total = 100.00 %

Fué preparado por primera vez en 1961 en los laboratorios Beecham Research. Ltd. por Doyle y colaboradores (U.S. pat. 2,985,648 (1961) ). ( 1 ).

✓ Se encuentra en diferentes formas :

Forma Anhidra.

Forma Hidratada.

Forma Trihidratada.

Forma de Sal de Sodio.

Forma de Sal de Potasio.

Punto de Fusión : 199 - 202°C para la forma anhidra.

Solubilidad : Es poco soluble en agua a temperatura ambiente.

Almacenamiento : En solución se conserva por largos periodos de tiempo, la forma anhidra es la más estable.

✓ 2.- Usos :

Ampicilina es un antibiótico de amplio espectro, esto quiere decir que es capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de gran cantidad de bacterias, Gram (+) y Gram (-). Se puede utilizar tanto en el hombre como en animales para combatir procesos infecciosos, sobre todo causados por : Sthaphilococcus, Streptococcus, E. coli, Salmonellas, Shigellas, etc... ; En la actualidad debido a que es tan efectivo como el cloramfenicol, tiene gran utilidad en el tratamiento de infecciones intestinales.

En los últimos años se han sintetizado algunos derivados de la Ampicilina, los cuales tienen el mismo efecto pero son absorbidos más rápidamente dentro del organismo, como :

Pivampicilina, Amoxicilina, etc... ; También se utilizan mezclas de antibióticos y combinación de ellos con otras sustancias, para aumentar la duración del efecto, como el Probenecid (ácido p - Dipropilsulfamiolbenzoico) ó enzimas como la Quimotripsina. ( 2,3,4,5,6,L2 y L3 ).

Estos antibióticos tienen la ventaja de ser relativamente poco tóxicos para el hombre y los animales, cuando se utilizan en grandes dosis y además cumplen con el hecho de que su potencia antibacterial contra microorganismos susceptibles es tal que en concentraciones de microgramos dan marcados efectos bactericidas. La única desventaja particular de este tipo de antibióticos es la de ser fuertes alérgenos en algunas personas y de esta manera causar reacciones alérgicas fatales. ( L4 ).

### 3.- Mecanismo de Acción.:

Al igual que todas las penicilinas, Ampicilina actúa principalmente por inhibición de las enzimas que intervienen en el entrelazamiento de los péptidos que son parte de los polímeros (polisacaridos - péptido), que forman el peptidoglicano ó Mureína de la pared celular. Específicamente afecta el úl-

timo paso de la biosíntesis, inhibiendo a una D - carboxipeptidasa que es la encargada de llevar a cabo la reacción.

Puesto que la síntesis de la pared celular es realizada solamente por células jóvenes que se están multiplicando activamente, la acción antibacteriana se manifiesta solo durante el proceso de crecimiento. ( L4,L5,L6,L7 y L8 ).

Experimentos llevados a cabo con diferentes bacterias, demuestran que la Ampicilina inhibe la acción de la D - carboxipeptidasa, unida a la membrana de B. megaterium ; D - D - carboxipeptidasa - transpeptidasa de Streptomyces R 61 ; y la D - alanina carboxipeptidasa aislada de B. subtilis. ( 7, 8 y 9 ).

#### 4.- Metabolismo :

Los prolongados niveles en sangre, baja filtración renal y la resistencia a la degradación por el hígado son las características metabólicas de la Ampicilina, la cual puede ser administrada por cualquier vía, ya sea oral, intramuscular ó intravenosa, su absorción y excreción varían dependiendo de la vía empleada. ( 10 ).

a).- Administración Oral.- El antibiótico debe absorberse gastrointestinalmente, para llegar a la sangre y de ahí ser distribuido hacia todo el organismo, se ha observado que la absorción es aproximadamente del 60 %, estudios en ratas demuestran que el transporte intestinal es pasivo.

Para una dosis de 500 mg. los niveles en sangre posteriores a la administración son : 1.9, 3.03, 1.26 y 0.29 /ml., después de 1, 2, 4 y 6 hrs. respectivamente, y la excreción urinaria fué de 19.6, 40.6, 52.2 y 55.4 % en 2, 4, 6 y 8 hrs respectivamente. Cuando se da una dosis de 250 mg., los niveles en sangre son : 2.1 a 1.7 /ml. a las 2 hrs., y la excreción urinaria 46 a 41 % a las 8 hrs., de haber iniciado el tratamiento. La vida media en el torrente sanguíneo es de 1 hora. ( 11,12,13,14 y 15 ).

b).- Administración Intramuscular.- Para una dosis de 500 mg., los niveles en sangre son : 5.72, 6.99, 3.98, 1.12, 0.35 y 0.14 /ml., después de 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 hrs., respectivamente, y la excreción urinaria es de : 66.3, 68.86, 69.11 y 69.116 % en 6, 12, 24 y 30 hrs. respectivamente, posteriores a la administración de la Sal de Sodio de Ampicilina. La vida media en el torrente sanguíneo es de 1 a 1.5 hrs ( 10,16 y 17 ).

c).- Administración Intravenosa.- Para una dosis de 500 mg. de Ampicilina, los niveles en sangre son : 11.86, 5.81, 1.97 y 0.11 /ml., después de 0.5, 1, 2 y 6 hrs. respectivamente, y la excreción urinaria es de : 72.48, 82.48, 87.00 y 87.66 % en 2, 4, 6 y 8 hrs. respectivamente. La vida media en el torrente sanguíneo es de 1 hora aproximadamente. Cuando se administran 500 mg. de sal de Sodio de Ampicilina, los niveles en sangre son : 17, 9.7, 6.06, 3.13, 2.06, 1.21,

0.62, 0.17 y 0.02 /ml., después de 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 hrs. respectivamente, y la excreción urinaria es de 72.6, 73.48 y 73.56 % en 6, 12 y 24 hrs. respectivamente. ( 13,16,17 y 18 ).

También se puede administrar por infusión intravenosa de 250 mg. de Ampicilina/hr. en adultos, y se ha observado que los adultos mayores ( 60 a 76 años de edad ) tienen niveles más altos en sangre que los adultos jóvenes. ( 19 ).

d).- Absorción y Excreción de otras Ampicilinas.- Ampicilina Trihidratada presenta niveles en sangre de 1.7 y 2.7 /ml., para dosis de 250 y 500 mg. respectivamente, 2 hrs. después de la administración y la excreción urinaria a las 24 horas es de 35 y 37 % para las mismas dosis.

La sal de Potasio de Ampicilina da niveles en sangre a las 2 hrs. de 5.2 /ml. y se excreta en orina el 38 % a las 12 hrs. de haber administrado una dosis de 1 g. ( 20 y 21 ).

Por otra parte se han realizado estudios a base de Ampicilina marcada con Azufre 35 y a partir de ellos se sabe que cuando la administración es oral, la excreción urinaria total es del 80 al 85 % y cuando es intravenosa se excreta el 87 % de la dosis empleada. ( 22 ).

e).- Administración con Probenecid.- Anteriormente se mencionó que el probenecid se ha utilizado como adyuvante de penicilinas en tratamientos infecciosos, esto se debe a que interfiere con la secreción tubular renal de estas sustancias -

y prolongan sus concentraciones plasmáticas, sin afectar : la biotransformación, la unión a proteínas ó fosfolípidos, ni el volumen de distribución de estos antibióticos. ( L2 y 6 ).

Se ha observado que el probenecid administrado oralmente aumenta la vida media de la Ampicilina y otros antibióticos en sangrey en bilis por lo que es muy usado en pacientes con tifoidea y enfermedades venereas. ( 5,23 y 24 ).

Los niveles en sangre de Ampicilina intramuscular, después de una dosificación anterior de Probenecid administrado oralmente en dosis de 500 mg. ambos, son : 7.87, 8.89, 8.85, 4.11, 1.66 y 0.85 /ml., después de 0.5, 1, 2, 4, 6 y 8 hrs. respectivamente, y la excreción urinaria es de : 49.3, 56.26, 57.31 y 57.36 % en 6, 12, 24 y 30 hrs. respectivamente. Y para Ampicilina intravenosa en las mismas dosis, los niveles en sangre son : 23.4, 13.9, 12.3, 8.33, 4.47, 2.82, 1.78, 0.77 y 0.35 /ml., después de 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 y 8 hrs. respectivamente, y la excreción urinaria es de 52.8, 55.58 y 55.96 % en 6,12 y 24 hrs. respectivamente. ( 17 ).

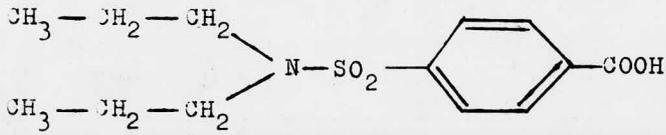
f).- Administración con Enzimas.- También se han utilizado enzimas proteolíticas para incrementar las concentraciones plasmáticas de los antibióticos, estudios hechos en rata con Quimotripsina demuestran que dando una dosis de 3 a 10 mg./Kg. de la enzima 1 hora antes de la administración intramuscular 10 a 100 mg./Kg. de Ampicilina, se incrementen los

niveles del antibiótico en sangre y en hígado por menos de 5 horas y en riñón y pulmones por menos de 4 horas, pero no tiene efecto sobre la distribución en tejidos, esto ocurre cuando están presentes simultáneamente ambas sustancias en el animal. Además se ha observado que la Tripsina produce el mismo efecto. ( 2,3 y 4 ).

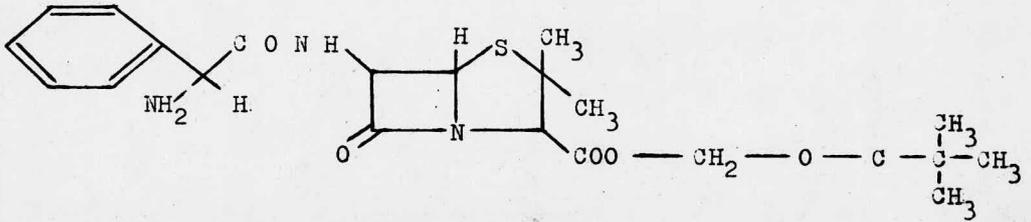
g).- Absorción y Excreción de algunos derivados de la Ampicilina.- Pivampicilina y Amoxicilina, el primero es hidrolizado en el tracto gastrointestinal transformándose en Ampicilina, su absorción oral después de una dosis de 500 mg es del 82 % en 1 hora, los niveles en sangre son : 11.6 y 5.53 /ml., después de 1 y 2 hrs. respectivamente, además se encuentran altas concentraciones de este antibiótico en hígado, riñón, suero, pulmones, bazo, corazón y cerebro (en orden decreciente), y su excreción urinaria a las 24 hrs. es de 56 y 71 % para dosis de 250 y 500 mg. respectivamente. ( 20,24,25 y 26 ).

Amoxicilina, para dosis de 250 y 500 mg., sus niveles en sangre son : 3.09 y 5.34 /ml., respectivamente después de 2 hrs. y su excreción urinaria es de 55 y 78.5 % en 6 y 8 hrs. respectivamente. La vida media en el torrente sanguíneo de estos 2 antibióticos es de 1 hora. ( 27,28,15 y 16 ).

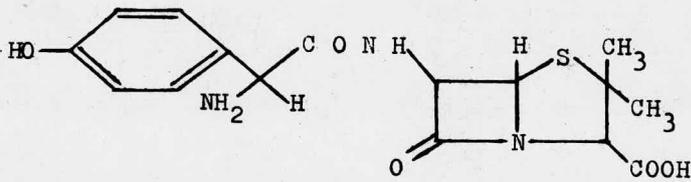
h).- Excreción Biliar.- La excreción de la Ampicilina no solo se lleva a cabo por medio de la orina, sino que también se excreta en bilis, experimentos en ratas han demostrado



PROBENECID.

( Acido *p*-Dipropilsulfamiolbenzoico ).

PIVAMPICILINA.



AMOXICILINA.

que la excreción biliar de este antibiótico es del 24 % a las 4 hrs., de haber administrado intravenosamente una dosis de 15 mg./Kg., y en general una excreción total del 65 al 72 %, de los cuales se excreta solo el 44 % del antibiótico biológicamente activo, esto se debe a que Ampicilina es resistente a la degradación por su alto carácter hidrofóbico (unión a Proteínas y fosfolípidos.). ( 29 y 30 ).

i).- Unión con Proteínas.- A este respecto se sabe que aproximadamente el 20 % del antibiótico circula en el organismo unido a una proteína, lo más probable es que la Ampicilina este unida a la albumina y también parece ser que se une a la bilirrubina. ( 31 ).

j).- Unión con fosfolípidos.- Existe interacción entre la Ampicilina y fosfolípidos, los cuales sirven de transporte para este tipo de antibióticos, la unión depende de la naturaleza del fosfolípido, estudios por filtración en Sephadex revelan que la unión es mayor con los fosfolípidos cargados negativamente : fosfatidilinositol, fosfatidilserina y menor con los neutros : fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, estas observaciones han sido confirmadas con RMN (Resonancia Magnética Nuclear), los cuales indican que la interacción es de naturaleza hidrofóbica con la contribución de fuerzas iónicas (resultados similares fueron observados en la unión de proteínas). Los fosfolípidos cargados negativamente incrementan el coeficiente de partición de la Ampicilina.

El porcentaje de unión se estima por Diálisis, obteniendo como resultado en moles % : fosfatidilcolina 15.6 %, fosfatidiletanolamina 18.2 %, fosfatidilserina 23 % y fosfatidilinositol 34.6 %. ( 32,33 y 34 ).

k).- En Páncreas.- Estudios hechos en perros revelan que la máxima concentración de Ampicilina en el fluido pancreático, ocurre 3 hrs., después de la administración intramuscular y es igual a la concentración de los niveles en sangre. ( 35 ).

En experimentos "in vitro" se ha observado que la Ampicilina inhibe la Lipólisis a concentraciones menores de 3 mg./100 ml., puede directamente afectar a la liposa pancreática ó alterar el estado fisiológico del sustrato. ( 36 ).

l).- En el Embarazo.- La Ampicilina es rápidamente transferida de la madre al feto, la administración intravenosa de muestra que los niveles en suero decrecen casi hasta cero en un lapso de 2 hrs., Ampicilina fué encontrada en el suero fetal 30 min. después de la dosificación maternal, en este último hay grandes concentraciones, mayores que los niveles mínimos para la inhibición de muchos organismos causantes de infecciones intrauterinas y se alcanza el equilibrio entre ambos sueros en 1 hora. En el fluido amniótico aparece a los 90 min. y la concentración se mantiene durante 8 hrs., después empieza a decrecer hasta las 19 hrs., este fluido es el mejor sitio de unión para estos antibióticos. La participa -

ción activa fetal es sugerida como mecanismo para alcanzar - altos niveles en el fluido amniótico en embarazos viables. Por lo expuesto anteriormente Ampicilina puede ser utilizada en el tratamiento de Amniótitis y sepsis intrauterina fetal. ( 37 y 38 ).

Por otra parte, Ampicilina administrada 500 mg. <sup>o</sup>/6 hrs. por 3 días, hace decrecer el estriol en la orina, pero no tiene efecto sobre el estradiol no conjugado del suero. Por este motivo es contraindicado en embarazos de alto riesgo. ( 39 ).

Experimentos en cuyes embarazadas, aplicandoles una infusión continua de Ampicilina, dieron como resultado niveles constantes que fueron : suero materno, suero fetal y fluido amniótico 300, 50 y 0.1 /ml. . Los máximos niveles de Ampicilina después de una sola inyección de 100 mg./Kg. fueron : suero materno, suero fetal 500 y 42 /ml., en 90 min. respectivamente. La vida media en el suero materno fué de 75 min. ( 40 ).

m).- Distribución.- En conejos después de haber administrado 50 mg./Kg., Ampicilina se distribuye en orden decreciente en : duodeno, riñón, estómago, plasma, pulmón, corazón, músculo, bazo e hígado.

En ratas se encuentra en plasma, riñón e hígado y después de una hora se acumula en pulmones, músculo y bazo. ( 41 y 42 ).

n).- Formación de un metabolito.- Se ha encontrado un metabolito en orina, suero y tejido homogenado de rata, se piensa que es un compuesto formado por la interacción del grupo amino de la Ampicilina con acetaldehído. Se ha hecho estudios en homogenado de hígado y riñón con resultados positivos, pero la transformación es reversible, esto se confirmó por cromatografía en capa fina. ( 43,44 y 45 ).

#### 5.- Toxicidad y Efectos sobre el Organismo :

a).- Toxicidad sobre el Sistema Nervioso Central.- Ampicilina no tiene ningún efecto sobre el S.N.C., excepto por algunos estudios en perros, en los que se ha observado un patrón repetido de pleocitosis en el fluido cerebroespinal. ( 45 ).

b).- Efectos Teratogénicos.- Tampoco fueron observados este tipo de efectos en ratas a las cuales se les dieron dosis de 1 g./Kg./día . La DL 50 fué de 3.75 g./Kg., administrada intravenosamente. ( 46 ).

c).- Toxicidad sobre la piel.- En ratones exhibe poca toxicidad y produce una moderada irritación local después de su administración intramuscular, además no se acumula. ( 47 y 48 ).

d).- Efecto sobre Glándulas Adrenales.- Ampicilina administrada intramuscularmente 50 mg./Kg., en 2 inyecciones a un ratón, decrece el nivel de catecolaminas especialmente de

adrenalina en las glándulas adrenales, sin afectar a las catecoláminas en sangre. ( 49 ).

e).- Efecto sobre Músculo Liso.- La Sal de Sodio de la Ampicilina tiene un efecto relajante sobre el músculo, su acción es directamente miocinética sobre los músculos bronquiales caninos "in vitro", e incrementa la respiración profunda. ( 50 ).

f).- Efecto sobre el Utero.- La Sal de Sodio de Ampicilina induce una acción inhibitoria sobre el músculo uterino de cuy, resultados similares se obtienen en perros. ( 51 ).

g).- Efecto sobre el tracto biliar.- Ampicilina causa la relajación del tracto biliar. ( 52 y 53 ).

#### 6.- Determinación :

Se puede realizar por muy variados y diferentes métodos, los más importantes son :

a).- Cromatografía en Capa Fina.- Es de los más utilizados por su facilidad de elaboración, rápida resolución y la gran sensibilidad del método. Existen muchas técnicas para llevar a cabo la identificación, separación y cuantificación de este tipo de antibióticos por por dicho procedimiento. Las principales se hacen sobre placas de Silicagel con indicador UV, los eluyentes, por ejemplo (Eluyente.- 20 : 15 : 3.5 de  $C_6 H_6$  : Dioxano : AcOH) varían según el investigador, al igual que los reveladores, de estos últimos los más emplea -

dos son : Solución de Ninhidrina al 0.3 % en Acetona ( 54 ), Sulfato de Cobre Amoniacoal (sensibilidad 30 ) ( 55 ), Acido Cloroplátinico (sensibilidad de 0.05 a 0.3 ) ( 56 ), Vapores de I<sub>2</sub>, Solución de Br<sub>2</sub> al 5 %, Solución de Fluoresceina de Sodio al 0.25 % ( 57 ), luz U.V. (254 nm.), Solución de I - NaN<sub>3</sub>, Solución de I<sub>2</sub> 0.1 N. ( 58 ) y Niquel, el cual es específico para Ampicilina. ( 59 ).

Dentro de este método existe una técnica especial de fase reversa. ( 60 y 61 ).

b).- Cromatografía en Columna.- Este método permite la purificación, separación y determinación de la Ampicilina y sus derivados, es muy sensible. ( 62 ).

c).- Cromatografía en Geles de Dextranas.- Es un método muy útil para separar : penicilinas, peiciloatos y peniciloiamidas. ( 63 ).

d).- Espectrofotometría :

i).- Directa.- Se basa principalmente en medir la absorvancia máxima del ciclo B-lactama de las penicilinas. Se puede llevar a cabo con la sustancia aislada o en mezclas, la primera se realiza a 320 m ( 64 ), y la segunda a 268 m a un pH de 5. ( 65 ).

ii).- Colorimétrica.- Tiene como fundamento, la formación de un compuesto colorido, el cual da una absorvancia máxima específica, que se puede medir en un espectrofotómetro. Las más usuales son : Reacción con Ninhidrina a 570 m ( 66 );

Como un complejo de Cobre (  $\text{Cu}^{++}$  ) a 313 - 315 m con un pH de 6.5 ( 67 ); y por reducción del Acido Fosfomolibdico a 770 m . ( 68 ).

iii).- Fluorometrica.- A diferencia de la colorimetrica esta técnica se fundamenta en la formación de un compuesto fluorescente que tiene una emisión y excitación específicas. La reacción es con fluoresceína en solución alcalina, la cual da una emisión en 422 m y excitación en 346 m ( 69 ), este método puede usarse para la determinación de Ampicilina en suero y orina, por intercambio.

iv).- Infra Rojo y Resonancia Magnética Nuclear.- Son métodos muy específicos y útiles en el análisis cualitativo y cuantitativo de penicilinas. ( 70 y 71 ).

e).- Titulación con Formol.- Es un método volumetrico, poco usado pero que también es útil en la determinación de este tipo de antibióticos. ( 72 ).

f).- Electroforesis de Alto Voltaje.- Es el más sofisticado de los métodos mencionados, pero muy efectivo para realizar la separación y determinación de Ampicilina en el plasma ( 73 ).

#### 7.- Destrucción de las Penicilinas :

Varias enzimas hidrolíticas, pueden atacar y destruir las penicilinas. La más común llamada penicilinasas, es producida por diferentes bacterias patógenas Gram ( + ) y Gram ( - ),

debido a esta enzima, dichas bacterias son resistentes a las penicilinas. Estas penicilinasas bacteriales, atacan la unión B-lactama de las penicilinas, por lo que se les da el nombre de B-lactamasas.

La capacidad de algunas bacterias para producir penicilinasas es constitutiva, pero en otras puede ser inducida Ej. : Ciertas cepas pueden ser sensibles a las penicilinas porque no producen penicilinasas, sin embargo al entrar en contacto con concentraciones no letales de cualquier penicilina, pueden inducir la formación de la enzima y a partir de entonces las bacterias podrán resistir concentraciones letales de penicilinas.

Otro punto de vista importante, es recordar que la producción de penicilinasas por un pequeño número de bacterias, puede ser eliminada con altas concentraciones de penicilinas. Por otra parte hay que considerar que podrían encontrarse grupos de bacterias infectando tejidos, capaces de producir suficiente penicilinasas para inactivar a la penicilina presente. A partir de esto podemos entender porque en el tratamiento de infecciones con penicilinas se procura mantener niveles altos de estas sustancias en sangre y fluidos corporales mediante dosis repetidas a intervalos específicos de tiempo.

La resistencia de cepas bacterianas hacia las penicilinas se puede deber a el uso tan exagerado y algunas veces descui

dado de estos antibióticos, aunque hay evidencias de que las cepas productoras de penicilinasa existen antes de empezar el tratamiento.

Otra clase de penicilinasa es producida por muchos géneros comunes de hongos, incluyendo a Penicillium, Aspergillus y Mucor. Las penicilinasas producidas por estos organismos difieren de la B-lactamasa bacterial, en que ellos atacan la unión peptídica entre el ácido 6 - aminopeicilánico y los radicales " R's ". Estas enzimas también son llamadas Penicilinamidases. ( L4 ).

## II.B.- GENERALIDADES SOBRE FAGOCITOSIS :

Los mecanismos de defensa del organismo contra una infección pueden ser Inespecíficos y Específicos, entre los primeros se encuentra uno de los más importantes, el de la Fagocitosis, que es un proceso por el cual son ingeridas y destruidas : bacterias, partículas de material dañino ó inútil de diversa índole, polvo de carbón inhalado, restos de eritrocitos ó de células muertas, etc... .

## 1.- Historia :

Metchnikoff (Premio Nobel en 1884) fué el primero en sospechar que el poder de algunas células ameboides para ingerir un número limitado de hongos en Daphnia (pulga de agua), tenía que ver con la defensa del animal contra la infección por dichos hongos. El llamó a esas células ameboides " células fagocíticas ". ( L4,L9,L10 y L11 ).

Después Denys y Leclef en 1895 y 1898 observaron la importancia de los componentes hemáticos no celulares en la ingestión fagocítica, ya que el suero inmune de un paciente estimulaba mucho más la fagocitosis que el suero de un individuo normal. Esto hizo pensar que existía en el suero inmune una sustancia capaz de estimular la actividad fagocítica de los leucocitos. ( L10 y L11 ).

Posteriormente Wright y Douglas en 1903 demostraron que el aumento de la fagocitosis causado por el suero inmune se debe a la acción de un componente de éste sobre las bacte -

rias más que sobre los leucocitos. Wright llamó a este componente Opsonina. ( L9, L10 y L11 ).

## 2.- Celulas Fagocíticas :

Hay 2 variedades principales de celulas fagocíticas : Macrófagos y Microfagos.

Los macrófagos incluyen a las celulas del Sistema Reticuloendotelial e histiócitos, y pueden ser fijos ó migratorios. Los fijos revisten el endotelio de los capilares y senos de organos como : bazo, hígado, medula ósea y ganglios linfáticos. Los migratorios viajan por todos los tejidos y ayudan a reparar las lesiones destruyendo y absorbiendo los materiales muertos y colaboran a suprimir los eritrocitos que han salido de los vasos sanguíneos. Como su nombre lo dice son celulas de gran tamaño y gran habilidad para fagocitar materiales extraños. ( L9, L10 y L12 ).

Los microfagos son los leucocitos polimorfonucleares, los cuales se originan en la medula ósea y comprenden aproximadamente el 70 % del número total de celulas blancas en la sangre. Se llaman así por el lobulado natural de sus núcleos, además son celulas granulocíticas, han sido descritos 3 tipos basandose en la naturaleza de los pequeños granulos en su citoplasma : Eosinofilos, se tiñen de rojo oscuro con colorantes ácidos como la Eosina ; Basófilos, se tiñen fuertemente con colorantes básicos como el Cristal Violeta ; y Neu

trófilos que no tienen ninguna afinidad en particular por colorantes ácidos ó básicos. De ellos los que poseen mayor actividad fagocítica son los neutrófilos. ( L4, L8, L9, L10 y L12 ).

Una característica importante de los polimorfonucleares es que pueden moverse entre los tejidos y fluidos del cuerpo por medio de pseudopodos y de esta manera llegar a donde se encuentran las partículas de material extraño, para fagocitarlas.

### 3.- Acción Opsónica :

Hay una serie de factores que influyen sobre la actividad fagocítica. En primer lugar esta el contacto que se establece entre la membrana celular de la célula fagocítica y la partícula extraña, en éste paso los primeros en influir son los componentes del suero sanguíneo, llamados opsoninas. La principal característica de la actividad opsónica es la habilidad de estas sustancias (que son anticuerpos) para cubrir a la partícula extraña limitando su movilidad y de esta manera dar oportunidad a que se adhieran a la membrana celular del fagocito.

Estudios hechos por Wright comprobaron que el componente estimulante de la fagocitosis en el suero llamado opsonina, era termolábil. La posible identidad entre la opsonina del suero normal y el complemento fué sugerida por su termolabilidad. Pero Minsser, Enders y Fothergill señalaron que esto

no significa forzosamente que la opsonina normal sea lo mismo que el complemento.

Zinsser, Enders y Fothergill llegaron a la conclusión de que factores ó anticuerpos séricos específicos pueden participar en ambas acciones opsónicas, la normal y la inmune.

La sustancia termolábil parecida al complemento acelera la fagocitosis sobre todo cuando hay anticuerpos en títulos relativamente bajos, la acción de este componente es menos aparente si se utilizan cantidades elevadas de anticuerpos. ( L4,L8,L10 y L12 ).

Las opsoninas son verdaderos anticuerpos cuya concentración se incrementa con el proceso inmunitario, con el que adquieren su carácter de especificidad. En general no ha sido posible demostrar una relación constante entre los componentes del complemento y la opsonización. Pero se ha demostrado que el componente termolábil de las opsoninas en suero humano es idéntico a las piezas  $C'_1$ ,  $C'_2$  y  $C'_4$  en combinación, más no separadamente. ( L12 y L13 ).

#### 4.- Inmonoglobulinas e Hipersensibilidad :

Ahora se sabe que las opsoninas son anticuerpos específicos que pertenecen a las IgG e IgM, de estas las primeras son las más abundantes en los fluidos internos del cuerpo, particularmente extravasculares, donde combaten a microorganismos invasores y sus tóxicas, formando complejos con ellos

que pueden adherirse fácilmente a las células fagocíticas, porque estas células tienen receptores de superficie especializados para sitios sobre la porción Fc de IgG (y también de  $C_3'$  ).

La Hipersensibilidad del tipo II ó Citotóxica se debe a lo ~~expuesto~~ anteriormente, ya que el anticuerpo se une al antígeno sobre la superficie de la célula causando la fagocitosis de la célula por adherencia opsónica (Fc) o adherencia inmune ( $C_3'$ ) ó la célula muere por operación de un sistema lítico de las fracciones  $C_8'$  y  $C_9'$  del Complemento. ( L11 ).

#### 5.- Quimiotaxis :

Este fenómeno también ayuda a que se efectuó la fagocitosis, se considera positiva (atracción) cuando se ejerce una migración de los leucocitos hacia bacterias vivas o muertas, extractos bacterianos, proteasas, peptonas y dextrinas procedentes de la descomposición parcial de proteínas y polisacáridos de origen bacteriano y tisular. Polisacáridos específicos de Staphilococcus y otras bacterias Gram (+) son netamente quimiotácticos, también lo son polisacáridos no bacterianos como almidón soluble, goma arábica e inulina, y las glucoproteínas de la mucina gástrica y del humor vítreo.

Un ejemplo de quimiotaxis negativa (no hay atracción) lo dan las endotoxinas de las bacterias Gram (-).

El mecanismo de la migración quimiotáctica no está aclarada

do todavía. Se supone que los efectos ósmóticos y la diferencia de potencial de superficie entre el leucocito y la célula bacteriana o la partícula, son las causas de la emigración ( L10 ).

6.- Factores que afectan la Fagocitosis "In Vitro" :

a).- Contacto de fagocito y partícula.- Fenn llegó a la conclusión de que la intensidad de la fagocitosis depende, en condiciones ideales, de las probabilidades de colisión entre fagocitos y partículas. Las probabilidades de colisión en suspensiones líquidas dependerán del volumen y densidad de las partículas en relación con el volumen y densidad de las células fagocíticas. Las partículas densas sedimentan en forma más rápida en un campo gravitacional y alcanzan a los fagocitos rápidamente, además las partículas voluminosas y los acumulos de células tienen mayor oportunidad de establecer colisión con los fagocitos que las partículas pequeñas y las células dispersas. También comprobó que la intensidad de la fagocitosis varía en proporción directa a la rapidez de mezcla durante la incubación. ( L10 ).

b).- Ingestión.- Consideraciones físicas indican que el hecho de que después de establecido el contacto se produzca ó no la ingestión, depende de las fuerzas de energía de superficie entre la partícula y el medio líquido, el fagocito y el líquido, y el fagocito y la partícula. La ingestión es

favorecida por los siguientes factores : i) Aumento de energía de superficie entre la partícula y el líquido suspensor, ii) Disminución de energía de superficie entre el fagocito y el medio suspensor, y iii) Disminución de energía de la interfase entre la partícula y el fagocito.

Berry llegó a la conclusión de que la fagocitosis aumenta cuando disminuye la tensión superficial o energía de superficie del leucocito, pero disminuye cuando se produce una reducción en la tensión superficial de la bacteria. ( L10 ).

c).- Efecto de Sales.- La fagocitosis puede ser afectada por varios iones. Los yoduros, fluoruro, sulfito y citrato de sodio disminuyen la fagocitosis. El cloruro de calcio es el único que aumenta netamente la intensidad de la fagocitosis.

d).- Efecto de la Temperatura.- La mayor parte de los investigadores están de acuerdo en que la intensidad de la fagocitosis aumenta al elevarse la temperatura hasta 40 ó 44°C. Ellingson y Clark comprobaron que de 38 a 40°C era la temperatura óptima para la fagocitosis de Staphilococcus en la sangre humana. ( L10 ).

#### 7.- Fagocitosis de Superficie :

La fagocitosis también puede ser llevada a cabo en ausencia de anticuerpos, pero depende de la naturaleza de la superficie, la cual tiene que ser rugosa para impedir que el

microorganismo escape y además para facilitar el trabajo del fagocito. En superficies lisas no se puede efectuar sin la ayuda de los componentes séricos. ( L4 y L10 ).

### 8.- Tipos de Fagocitosis :

a).- Espontánea.- Participan relativamente pocos fagocitos y se ingiere un número muy pequeño de bacterias, no se requiere ni de anticuerpo ni complemento. Ej. : Fagocitosis de Superficie.

b).- Normal.- Se produce intensamente, pueden intervenir el complemento, el anticuerpo normal ó ambos.

c).- Inmune.- Es muy activa, pero necesita del anticuerpo específico y del complemento para acelerar el proceso. ( L10 ).

### 9.- Mecanismo de la Fagocitosis :

Tan rápido como el contacto es establecido entre la bacteria invasora y una célula fagocítica, la bacteria es generalmente ingerida por la célula, pero hay algunas como Neumococcus, Streptococcus, Haemophilus y otros que poseen una estructura capsular la cual les permite evadir la acción fagocítica en un individuo normal, ya que en uno inmune al material capsular específico, esta ventaja es neutralizada.

El hecho de enguir una partícula extraña dentro de la célula ha sido recientemente establecido.: Una vez que la partícula es enguida por la célula, queda rodeada por una por -

ción de la membrana celular formando una especie de vacuola llamada Fagosoma. Las enzimas degradativas (por ejemplo ácidohidrolasas) de una célula están contenidas en unas estructuras, también parecidas a las vacuolas, llamadas Lisosomas, la producción de estas enzimas es llevada a cabo inmediatamente después de que la partícula es ingerida. Dentro de la célula el Fagosoma y el Lisosoma se fusionan para formar otra estructura llamada Fagolisosoma, donde la partícula extraña es atacada por las enzimas degradativas y digestivas. El Fagolisosoma conteniendo los restos de la partícula es eliminado de la célula u olvidado en el citoplasma.

Sin embargo la fagocitosis puede no ser benéfica contra una infección, ya que hay numerosos ejemplos de microorganismos que se multiplican dentro de los fagocitos (por ejemplo Brucellas y virus) y además estas células pueden proteger al microorganismo de anticuerpos y antibióticos y al mismo tiempo ofrecer un medio de transportación a otras regiones del cuerpo. ( L11 y L12 ).

#### 10.- Métodos de Estudio :

Las investigaciones más precisas sobre fagocitosis se han efectuado "In Vitro", generalmente empleando como células fagocíticas a los neutrófilos, porque son los leucocitos más abundantes en la sangre y pueden obtenerse con relativa facilidad.

El método principal es la técnica del Índice Fagocítico, descrita por Wright y Douglas en la que determinan el número medio de partículas ingeridas por cada leucocito en un periodo de tiempo específico.

También se puede estudiar la fagocitosis cualitativamente "In Vivo", por métodos histológicos. ( L10 ).

#### 11.- Medición de la Actividad Opsónica :

Para realizar esta se utiliza la técnica anterior, determinando el Índice Fagocítico de un paciente inmune y el mismo índice de algunas personas consideradas normales. El Índice Opsónico del paciente se calcula dividiendo su Índice Fagocítico entre el Índice Fagocítico Normal.

Cuando es mayor que 1 indica que el poder opsonizante es mayor que el de los individuos normales y se observa en pacientes que se encuentran en recuperación.

También se ha utilizado la prueba opsonocitofágica para la detección de Brucelosis. Se mezcla sangre fresca citrada del paciente con un volumen igual de una suspensión concentrada de germen lisos de Brucella. La mezcla se incuba en baño María a 37°C durante 30 min. . Se examinan frotis teñidos y se valora el grado de fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares según el número de bacterias ingerido :

Fagocitosis negativa	Ninguna bacteria ingeridas.
Fagocitosis ligera	1 a 20 bacterias ingeridas.

Fagocitosis moderada	21 a 40 bacterias ingeridas.
Fagocitosis intensa	+ de 40 bacterias ingeridas.

Los individuos con fagocitosis negativa ó ligera, probablemente sean sensibles a la Brucelosis. Una fagocitosis intensa indica fuerte inmunidad, esto se presenta en un convaleciente o en una persona restablecida de la infección. Fagocitosis moderada se observa en personas que estan inmunizadas pero que pueden sufrir la enfermedad. ( L10 ).

12.- Fagocitosis en la Valoración de Antisépticos y Antibióticos :

El coeficiente fenólico y otros indices de actividad germicida solo proporcionan información parcial para estimular el valor de antisépticos y antibióticos. Los productos químicos tóxicos para las bacterias, también pueden serlo para los tejidos humanos. Una valoración completa necesita la determinación de la concentración a la cual inhibe ó mata a las bacterias sin lesionar los tejidos humanos.

Welch y Hunter modificaron la prueba opsonocitofágica para la detección de Brucelosis, con el fin de valorar la toxicidad de diversos antisépticos y antibióticos de uso común. Esta técnica mide la concentración del antiséptico ó antibiótico que inhibe la fagocitosis. ( L10 ).

También la técnica mide a que concentración no se inhibe la fagocitosis, con lo cual se puede saber si el farmaco es

tóxico, además se pueden hacer estudios comparativos.

13.- Estudios acerca de la Acción de la Ampicilina sobre la Fagocitosis :

Estudios "In Vitro" indican que la Ampicilina es capaz de unirse a los linfocitos sanguíneos, además se ha observado que la presencia de concentraciones no letales de este antibiótico enmascara la actividad fagocítica de los leucocitos sanguíneos para L. monocitogenes. Pretratamiento de los macrófagos con las drogas, no tienen efecto sobre la actividad fagocítica, el mecanismo de acción de los antibióticos sobre la fagocitosis aún no es bien conocido. ( 74 y 75 ).

Por último se sabe que la actividad fagocítica decrece en los días 4<sup>o</sup> al 10<sup>o</sup> después de la administración oral de 800 u/Kg., 2 veces al día durante 4 días de Ampicilina, posterior a los 23 días de inmunización con eritrocitos. ( 76 ).

## III.- PARTE EXPERIMENTAL :

## III.A.- DETERMINACION CITOTOXICA DE LA AMPICILINA

" IN VITRO ".

A.1.- Obtención del Material Biológico.

A.2.- Preparación del Antígeno (Cepa Bacteriana).

A.3.- Preparación de las diluciones del  
Antibiótico y el Testigo.

A.4.- Técnica.

## III.B.- DETERMINACION CITOTOXICA DE LA AMPICILINA

" IN VIVO ".

B.1.- Formación del Abceso.

B.2.- Administración del Antibiótico.

B.3.- Obtención del Material Biológico.

B.4.- Técnica.

El método empleado para determinar la citotóxicidad de la Ampicilina, es el descrito en 1940 por Welch y Hunter en la valoración de antisépticos y antibióticos. Tiene por objeto demostrar la toxicidad de estos compuestos por medio de la inhibición de la Fagocitosis y recibe el nombre de " INDICE OPSONOCITOFAGICO ". ( 77 ).

## III.A.- DETERMINACIÓN CITOTÓXICA DE LA AMPICILINA

## " IN VITRO ":

## 1.- Obtención del Material Biológico :

Seleccionar un conejo sano, y colocarlo en una caja con soporte móvil, el cual permite acomodarlo de tal manera que el cuello del mismo quede entre el soporte y la caja, facilitando así la salida de la cabeza del animal, evitando el movimiento de este al momento de tomar la muestra. Después desinfectar la zona de la vena marginal de la oreja con alcohol ó solución de Iodo y dar masaje con el fin de estimular la circulación ; se procede a puncionar la vena asepticamente, para obtener 2 ml. de sangre en una jeringa con una aguja de calibre 22, en la cual fué puesto con anterioridad 1ml de una solución de Citrato de Sodio al 2 % (la dilución del Citrato de Sodio es de 0.78 %), mezclar con la sangre cuidadosamente, para evitar que se coagule, y enseguida pasarla a un tubo de ensaye, éste último se coloca en el refrigerador para impedir que los polimorfonucleares sufran lisis. La muestra de sangre obtenida de esta manera deberá utilizarse en un tiempo máximo de 5 horas después de la punción.

## 2.- Preparación del Antigéno (Cepa Bacteriana) :

(Cepa de *Staphilococcus aureus*, coagulasa positivo).

Inocular la cepa en un medio de Agar nutritivo, para desarrollar su crecimiento, incubar durante 48 hrs. a una temperatura de 37°C. Después cosechar el desarrollo bacteriano

con solución Salina Isótonica, formando una suspensión, está se coloca en un matraz y se le añade un volúmen igual de una solución de Sulfato de Hierro y Amonio al 1 % (con el fin de sensibilizar la pared celular de las bacterias), dicha suspensión se incuba durante 2 a 3 hrs. a 37°C, posteriormente centrifugar y desechar el sobrenadante, el boton celular se lava 2 veces con solución Salina Isótonica y finalmente agregar 2 veces el volúmen de celulas de solución Salina Isótonica. ( L13 ).

Esta suspensión bacteriana, para ser utilizada debe diluirse hasta obtener una concentración de 500,000,000 de celulas por ml. ; lo anterior se lleva a cabo por medio del método de Macfarland, a base de una curva standart de Sulfato de Bario. ( L14 ). La suspensión así preparada puede utilizarse en un tiempo máximo de 30 días.

### 3.- Preparación de las diluciones del Antibiótico y el

#### Testigo :

Pesar 1000 mg. de Ampicilina y disolver en 10 ml. de solución Salina Isótonica, para obtener una concentración de 100 mg./ml. que equivale a la dilución  $10^0$ .

Después tomar 1 ml. de la dilución anterior y añadir 9 ml. de solución Salina Isótonica, para obtener una concentración de 10 mg./ml., que equivale a la dilución  $10^{-1}$ , de esta manera se procede consecutivamente hasta obtener una concentra -

ción de 0.000,000,01 mg./ml., que equivale a la dilución  $10^{-10}$ . El testigo es la solución Salina Isotónica.

#### 4.- Técnica :

a).- Colocar 0.2 ml de las diluciones del antibiótico en tubos de 13 x 100, previamente marcados par  $^{\circ}/u$  de las diluciones. Para preparar el testigo, se sustituyen los 0.2 ml de la dilución por solución Salina Isotónica.

b).- Homogenizar la sangre agitando y añadir 0.2 ml de ella en  $^{\circ}/tubo$ .

c).- Por último agregar 0.2 ml de la suspensión antigénica en  $^{\circ}/tubo$ .

d).- Después colocar los tubos en una incubadora a  $37^{\circ}C$ , agitando  $^{\circ}/10$  min. (para incrementar el contacto entre bacterias y fagocitos), durante 1 hora.

e).- Transcurrido el tiempo de incubación agitar suavemente  $^{\circ}/u$  de los tubos y proceder a realizar 1 ó 2 frotis de  $^{\circ}/dilución$ , sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, procurando terminar el frotis a la mitad del portaobjetos, ya que los leucocitos tienden a acumularse en la última porción de la película de sangre. El frotis puede ser secado al mechero ó por medio de una corriente de aire caliente.

f).- Posteriormente teñir los frotis con colorante de Wright, de la siguiente manera : agregar 0.5 ml. de colorante a  $^{\circ}/frotis$  y dejar teñir durante 1 min., después agregar

1 ml. de Buffer de Fosfatos a pH de 6.5 y dejar teñir otros 4 min. . Lavar con agua corriente ó con la misma solución Buffer y secar al aire. ( L15 ).

g).- Observación al Microscopio: Colocar el frotis sobre la platina y buscar el campo deseado por medio del objetivo seco fuerte, después observar con el objetivo de inmersión, con el fin de contar el número de bacterias fagocitadas en 25 polimorfonucleares.

Nota : Todo el material y las soluciones empleadas en esta prueba deben estar perfectamente esteriles.

como base la concentración tóxica de la ampicilina encontrada en el experimento " In Vitro", a partir de esta calcular la concentración de Ampicilina que se debe administrar al conejo.

Calculos :

Dilución tóxica " In Vitro " :  $10^{-3} = 0.1 \text{ mg./ml.}$

0.1 mg. ----- 1 ml. (sangre)

x mg. ----- 5000 ml. (sangre). (adulto)

x = 500 mg.

(adulto) 50 Kg. ----- 5000 ml. (sangre)

(conejo) 3 Kg. ----- x ml. (sangre)

x = 300 ml. (sangre)

500 mg. ----- 5000 ml. (sangre) (adulto)

x mg. ----- 300 ml. (sangre) (conejo)

x = 30 mg. de Ampicilina.

Dosis caculada : 30 mg. de Ampicilina cada 6 horas.

Hay que considerar, que en el experimento " In Vitro ", la concentración del antibiótico en sangre es total y que al administrar la misma sustancia a un ser vivo, la absorción por el organismo no es del 100 %, y además existe excreción del mismo, por estos motivos se debe utilizar una concentración de : 240 mg. de Ampicilina cada 6 horas, para obtener la inhibición de la fagocitosis. Esta concentración se obtuvo duplicando consecutivamente la dosis calculada al inicio del experimento.

### 3.- Obtención del Material Biológico :

Colocar al conejo en una caja con soporte movable, el cual permite acomodarlo de tal manera que el cuello del mismo quede entre el soporte y la caja facilitando así la salida de la cabeza del animal, evitando el movimiento de este al momento de tomar la muestra. Después desinfectar la zona de la vena marginal de la oreja con alcohol o solución de Iodo y dar masaje con el fin de estimular la circulación ; se procede a puncionar la vena asepticamente, para obtener 1 ml. de sangre en una jeringa con una aguja de calibre 22, en la cual fué puesto con anterioridad 0.05 ml. de una solución de Citrato de Sodio al 2 % (la dilución del Citrato de Sodio es de 0.78 %), mezclar con la sangre cuidadosamente, para evitar que se coagule, y enseguida pasarla a un tubo de ensaye, esté último se coloca en el refrigerador para impedir que los polimorfonucleares sufran lisis. La muestra de sangre obtenida de esta manera deberá utilizarse en un tiempo máximo de 5 horas después de la punción.

Los 2 conejos tanto "testigo" como "problema" son muestreados de la forma descrita anteriormente, a las 24 y 48 horas de haber iniciado el tratamiento con el antibiótico en cuestión.

Se debe tener cuidado en marcar y rotular perfectamente las muestras, con el fin de no confundirlas y evitar resultados erróneos.

## 4.- Técnica :

a).- Homogenizar la sangre, tanto del "testigo" como del "problema" agitando y colocar 0.2 ml. de  $\frac{c}{u}$  en sendos tubos de ensaye marcados respectivamente "testigo" y "problema".

b).- A continuación añadir 0.2 ml y 0.4 ml. de solución Salina Isótonica al "testigo" y "problema" respectivamente.

c).- Por último agregar solamente al "testigo" el antigéno (suspensión bacteriana de *Staphilococcus aureus*, la cual debe tener una concentración de 500,000,000 de células/ml.). La manera de preparar dicha suspensión se describe en la pagina ( 34 ). Al "problema" no se le añade el antigéno, debido a que este se debe encontrar en la sangre al momento de tomar la muestra.

d).- Después colocar los tubos en una incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$ , agitando  $\frac{c}{u}$  /10 min. (para incrementar el contacto entre bacterias y fagocitos), durante 1 hora.

e).- Transcurrido el tiempo de incubación agitar suavemente  $\frac{c}{u}$  de los tubos y proceder a realizar 1 ó 2 frotis de  $\frac{c}{u}$  de ellos, sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, procurando terminar el frotis a la mitad del portaobjetos, ya que los leucocitos tienden a acumularse en la última porción de la película de sangre. El frotis puede ser secado al mechero o por medio de una corriente de aire caliente.

f).- Posteriormente teñir los frotis con colorante de Wright, de la siguiente manera : agregar 0.5 ml. de coloran

te a <sup>c</sup>/frotis y dejar teñir durante 1 min., después agregar 1 ml. de Buffer de Fosfatos a pH de 6.5 y dejar teñir otros 4 min. . Lavar con agua corriente ó con la misma solución Buffer y secar al aire. ( L15 ).

g).- Observación al Microscopio: Colocar el frotis sobre la platina y buscar el campo deseado por medio del objetivo seco fuerte, después observar con el objetivo de inmersión, con el fin de contar el número de bacterias fagocitadas en 25 polimorfonucleares.

Nota : Todo el material y las soluciones empleadas en esta prueba deben estar perfectamente esteriles.

## IV.- RESULTADOS :

Se deben estimar, según el grado de fagocitosis que presentan las células :

Fagocitosis negativa = ninguna bacteria ingerida.

F. " ligera = 1 a 20 bacterias ingeridas.

F. " moderada = 20 a 40 bacterias ingeridas.

F. " intensa = + de 40 bacterias ingeridas.

Al hacer la observación microscópica, fué muy difícil poder contar el número de bacterias fagocitadas, por lo que los resultados están reportados en base a la presencia ó ausencia de fagocitosis.

El experimento " In Vitro " se realizó 25 veces, de las cuales las 10 primeras sirvieron para eliminar las diluciones  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  ya que en estas se observaba una fagocitosis muy intensa.

Las siguientes 10 se llevaron a cabo con las diluciones restantes, determinando que las diluciones  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  también presentaban una fagocitosis intensa.

Los últimos 5 ensayos fueron para confirmar cual era la dilución en la que se inhibía la fagocitosis (punto final tóxico), la observación dió como resultado que la dilución tóxica es  $10^{-3}$  que equivale a una concentración de 0.1 mg./ml.

El experimento " In Vivo " se realizó 6 veces : En los 1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup>, 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> ensayos se utilizaron dosis de 30, 60, 120, 150 y 180 mg. <sup>c</sup>/6 hrs. respectivamente y en ninguno de ellos se observó inhibición de la fagocitosis, en el último ensayo

se utilizó una dosis de 240 mg. <sup>c</sup>/6 hrs., observandose hasta entonces inhibición de la fagocitosis.

Concentración Tóxica " In Vitro " : 0.1 mg./ml.

Concentración Tóxica " In Vivo " : 0.8 mg./ml.

## V.- DISCUSION :

Como se podrá observar el problema principal con este tipo de sustancias es el uso exagerado y descuidado de ellas, fomentándose la producción de cepas de microorganismos resistentes a estos quimioterápicos.

Desde el punto de vista inmunológico, el uso exagerado de los antibióticos como la Ampicilina, puede ser negativo, debido a que impide el desarrollo del microorganismo invasor y su fagocitosis normal, eliminando de esta manera la oportunidad de que el paciente adquiriera una inmunidad activa y además permitiendo que el paciente pueda sufrir una reinfección causada por una cepa resistente a la quimioterapia.

Por lo tanto los antibióticos deben ser usados en casos de infecciones agudas, bajo el control de un medico competente y con las medidas de seguridad pertinentes para ayudar al restablecimiento del paciente y evitar las reinfecciones y la producción de cepas resistentes,

Ahora bien, la técnica empleada es relativamente sencilla pero se debe tener cuidado en mantener las condiciones de esterilidad y temperatura adecuadas, para evitar la obtención de resultados erróneos.

Hay que considerar que la sangre normal tiene una acción bactericida definida, que varía con el huésped y el microorganismo invasor, esta variación depende : de la condición física, poder opsonico de la sangre, número y eficiencia de leucocitos presentes con respecto al huésped y además de la

especie, virulencia y número de microorganismos involucrados.

Durante el desarrollo de la parte experimental se puede observar que la fagocitosis aumenta al disminuir la concentración del antibiótico, esto podría significar que los niveles sub-bacteriostáticos de la Ampicilina incrementan el proceso de la fagocitosis, aunque también puede provocar la producción de cepas resistentes. Esto puede ser posible pero aún es una intriga, ya que no se conoce el mecanismo por el cual los antibióticos ayudan ó inhiben la fagocitosis.

Es muy probable que la Ampicilina inhiba la fagocitosis actuando sobre factores humorales y no sobre los polimorfonucleares, ya que estos no son destruídos a pesar de las altas concentraciones del antibiótico.

Para finalizar, tomando en cuenta los resultados obtenidos y los datos reportados en la pagina ( 6,7 y 8 ), podemos concluir que la Ampicilina no es citotóxica para el hombre y los animales en las concentraciones que se utiliza actualmente en el tratamiento de procesos infecciosos, ni durante tiempos prolongados de administración.

## VI.- BIBLIOGRAFIA :

VI.A.- ARTICULOS.

VI.B.- LIBROS.

## VI.A.- ARTICULOS :

- 1.- Doyle, et al.  
Preparation of Ampicillin.  
J. Chem. Soc., 1962, 1440.
- 2.- Butylina, L. V. ; Geitman, I. Ya. ; Kyvman, G. Ya. .  
Efficient use of ampicillin in combination with chymo  
trypsin.  
Antibiotiki (Moscow), 1975, 20 (5), 458 - 62.
- 3.- Butylina, L.V. ; Geitman, I. Ya. ; Kivman, G. Ya. .  
Use of experiment design in studies on the effect of  
proteolytic enzymes on antibiotic pharmacokinetics.  
Antibiotiki (Moscow), 1975, 20 (10), 929 - 33.
- 4.- Butylina, L.V. ; Geitman, I. Ya. ; Kivman, G. Ya..  
Comparison on effects of trypsin and chymotrypsin on  
the pharmacokinetics of penicillins in rats.  
Antibiotiki (Moscow), 1975, 20 (11), 1019 - 23.
- 5.- Kampmann, J. ; Lindahl, F. ; Moelholm Hansen, J. ;  
Siersback-Nielsen, K. .  
Effect of probenecid on the excretion of ampicillin  
in human bile.  
Brit. J. Pharmacol., 1973, 47 (4), 782 - 6.
- 6.- Levy Gerhard.  
Effect the probenecid on blood levels and urinary  
recovery of ampicillin.  
Am. J. Med. Sci., 250 (2), 174 - 6, (1965).
- 7.- Diaz-Maurino, T. ; Nieto, M. ; Perkins, Harold R. .

Membrane bound D D-carboxypeptidases from *Bacillus megaterium* KM. General properties, substrate specificity and sensitivity to penicillins, cephalosporins, and peptide inhibitors of activity at pH 5.

Biochem. J., 1974, 143 (2), 391 - 402.

8.- Frere, Jean M. ; Ghuysen, Jean M. ; Itwatsubo, Motohiro.

Kinetics of interaction between the exocellular D D - carboxypeptidase - transpeptidase from *Streptomyces R61* and B-lactam antibiotics. Choice of models.

Eur. J. Biochem., 1975, 57 (2), 343 - 51.

9.- Umbreit, Jay M. ; Strominger, Jack L. .

Biosynthesis of the peptidoglycan of bacterial cell walls. XXXIV. D-alanine carboxypeptidase from *Bacillus subtilis* membranes.II. Interaction with penicillins and cephalosporins.

J. Biol. Chem., 1973, 248 (19), 6767 - 71.

10.- Kirby, William M.M. ; Kind, Allan C. .

Clinical pharmacology of ampicillin and hetacillin.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1967, 145 (2), 291 - 7.

11.- Jordan, M. C. ; De Maine, James B. ; Kirby, William M

Clinical pharmacology of pivampicillin as compared with ampicillin.

Antimicrob. Ag. Chemother., 1970 (Pub. 1971), 438 - 41.

12.- MacLead, C. ; Rabin, H. ; Ogilvie, R. ; Ruedy, J. ;

Caron, M. ; Zarowny, D. ; Davies, R.O. .

Practical concepts of drug absorption, distribution and loss.

Can. Med. Assoc. J., 1974, 111 (4), 341 - 6.

13.- Modr, Zdenek ; Dvoracek, Karel ; Vicek, V. .

Pharmacokinetics of ampicillin and hetacillin in man.

Progr. Antimicrob. Anticancer Chemother., Proc. Int.

Congr. Chemother., 6th 1969 (Pub.1970), 1, 646 - 9.

Univ. Park Press : Baltimore, Md. .

14.- Verbist, L. .

Triple crossover study on absorption and excretion of ampicillin, pivampicillin and amoxicillin.

Antimicrob. Ag. Chemother., 1974, 6 (5), 588 - 93.

15.- Roholt, K<sup>\*</sup> ; Nielsen, B. ; Kristensen, E. .

Clinical pharmacology of pivampicillin.

Antimicrob. Ag. Chemother., 1974, 6 (5), 563 - 71.

16.- Stojanovic, M. ; Krdzalic, N. ; Zivkovic, Z. ; Vukadinovic, R. .

Concentration of ampicillin in rabbit blood after parenteral and oral administration.

Kem. Ind., 1975, 24 (7), 370 - 2.

17.- Theodore C. E. ; Jay W. K. ; and Maxwell, F. .

Sodium ampicillin : absorption and excretion of intramuscular and intravenous doses in normal young man.

Am. J. Med. Sci., 249 (2), 163 - 71, (1965).

18.- Berte, F. ; Arrigoni, E. ; Benzi, G. .

Plasma, urine and bile levels of ampicillin after

(im.) treatment with ampicillin Na and benzathine ampicillin in dogs and man.

Farmaco, Ed. Prat., 1972, 27 (4), 205 - 13.

19.- Simon, C. ; Malerczyk, V. ; Zierott, G. ; Lehman, K.;; Thiesen, U. .

Blood, urine and bile levels of ampicillin after continuous infusion.

Arzneim - Forsch., 1975, 25 (4), 654 - 6.

20.- Foltz, E.L. ; West, J.W. ; Breslow, I.H. ; Wallick, H  
Clinical pharmacology of pivampicillin.

Antimicrob. Ag. Chemother., 1970, (Pub.1971), 442 - 54.

21.- Somerkamp, H. ; Nathrath, D. .

Pharmacokinetics of ampicillin-potassium in healthy subjects and patients with glomerular renal insufficiency.

Fortschr. Med., 1974, 92 (10), 435,437 - 9,441.

22.- Swahn A.

On the absorption and metabolism of sulfur = 35 - la-beled ampicillin.

Eur. J. Clin. Pharmacol., 1975, 9 (2 - 3), 117 - 24.

23.- Vitti, T.G. ; Gurwith, M.J. ; Ronald, A.R. .

Pharmacologic studies of amoxicillin in nonfasting adults.

J. Infec. Dis., 1974, 129 (Suppl.), S147 - S151.

24.- Garaci, E. ; Ravagnan, G. ; D'Antonio, D. .

Tissue distribution of pivampicillin.

- Antibiotica, 1972, 10 (1 - 2), 5 - 15.
- 25.- Ueda, Y. ; Matsumoto, F. ; Saito, A. ; Shimada, J. ;  
Omori, M. ; Kobayashi, Ch. ; Shiba, M. .  
Pivampicillin.  
Chemoterapy (Tokyo), 1974, 22 (4), 417 - 21.
- 26.- J.C.K., Loo ; E.L., Foltz ; H. Wallick ; K.C., Kwan..  
Pharmacokinetics of pivampicillin and ampicillin in man.  
Ciln. Pharmacol. Ther., 16 (1), July 1974, 35 - 43.
- 27.- Lodola, E. ; Marca, G. .  
Amoxicillin (I), a new semisynthetic penicillin.  
G. Ital. Chemioter., 1973, 20 (1 - 4), 27 - 35.
- 28.- Janisch, P. ; Lode, H. ; Kupper, G. ; Weuta, H. .  
Clinical pharmacology of four orally administered  
ampicillin.  
Prog. Chemoter. (Antibacterial, Antiviral, Antineoplas-  
t.) Proc. Int. Congr. Chemoter., 8th, 1973, (Pub  
1974), 1, 547 - 51.
- 29.- Ryrfeldt, Ake.  
Biliary excretion of penicillins in the rat.  
J. Pharm. Pharmacol., 1971, 23 (6), 463 - 4.
- 30.- Ryrfeldt, A. ; Bodin, N.O. ; Hansson, E. .  
Biliary excretion of ampicillin, azidocillin, and ben-  
zylpenicillin in the rat.  
Acta Pharmacol. Toxicol., 1973, 33 (3), 219 - 28.
- 31.- Tan, James S. ; Bannister, Thomas ; Phair, John P. .

Levels of amoxicillin and ampicillin in human serum and interstitial fluid.

J. Infec. Dis., 1974, 129 (Suppl.), S144 - S146.

32.- Padfield, John M. ; Kellaway, I.W. .

Interaction of penicillins with phospholipids.

J.Pharm.Pharmacol., 1972, 24 (Suppl.), 171 p. .

33.- Padfield, John M. ; Kellaway, I.W. .

Transport of penicillins across nonaqueous membranes in the presence of phospholipids.

J. Pharm. Pharmacol., 1973, 25 (Suppl.), 160 - 161.

34.- Padfield, John M. ; Kellaway, I.W. .

The diffusion of penicillin G and ampicillin through phospholipids sols.

J. Pharm. Pharmacol., 1975, 27 (5), May., 348 - 52 .

35.- Takayama, Hiroo.

Experimental studies on the distribution of various antibiotics to the pancreatic fluid.

Jap. J. Antibiot., 1973, 26 (5), 427 - 28.

36.- Satlish, K. ; Mehta, E.W. ; Marvin, H. S. .

Neomycin inhibition of lipolysis in vitro.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 125 (3), 905 - 7, (1967).

37.- Malcom A. MacAulay ; M. Abou-Sabe ; David Charles. .

Placental transfer of ampicillin.

Amer. J. Obstet. Gynecol., 96 (7), 943 - 56, (1966).

38.- Ronald E. B. ; Roger W.B. ; Wayne L.J. .

Transfer of ampicillin into fetus and amniotic fluid from maternal plasma in late pregnancy.

Amer. J. Obstet. Gynecol., 96 (7), 938 - 42, (1966).

39.- Boehm, F.H. ; De Pietro, D.L. ; Goss, D.A. .

Effect of ampicillin administration on urinary estradiol and serum estradiol in the normal pregnant patient.

Amer. J. Obstet. Gynecol., 1974, 119 (1), 98 - 103.

40.- Chelius, H.H. ; Husstedt, W. ; Freisleben, H. .

Maternofetal kinetics of antibiotics in animal experiments. I . Ampicillin.

Geburtshilfe Frauenheilkd., 1975, 35 (4), 280 - 4.

41.- Berte, F. ; Manzo, L. ; De Bernardi, M. ; Benzi, G. .

Distribution of ampicillin administered orally in three different forms in rabbit.

J. Pharm. Sci., 1971, 60 (5), 805 - 6.

42.- Uba, F. ; Gu, K. ; Okamoto, Y. ; Okubo, H. .

Experimental studies on ampicillin for aqueous suspension.

Jap. J. Antibiot., 1973, 26 (3), 294 - 6.

43.- Nishida, M. ; Mine, Y. ; Murakawa, T. ; Fukada, Sh. ;

Kono, Y. ; Sueda, Y. .

Metabolism of ampicillin. I. Formation and activity of a new metabolite.

Nippon Kagaku Ryohoga Kukai Zasshi, 1971, 19 (3), 170 - 3.

44.- Murakawa, T. ; Kono, Y. ; Nishida, M. .

Formation and activity of the transformation product

of ampicillin. II.

J. Antibiot., 1972, 25 (7), 421 - 6.

45.- Weiss, M. H. ; Kurze, T. ; Nulsen, F. E.

Antibiotic neurotoxicity. Laboratory and clinical study.

J. Neurosurg., 1974, 41 (4), 486 - 9.

46.- Bachev, S. ; Petrova, L. ; Voicheva, V. ; Shishkova,  
M. ; Kolev, N. . (Bulg.).

Teratogenic effect and acute and chronic toxicity of  
ampicillin.

Suvrem. Med., 1974, 25 (7), 28 - 32.

47.- Khosid, G.M. ; Shteinberg, G.B. ; Balavanova, E.L. ;  
Baru, R.V. ; Churagulova, N.K. ; Lapchishkaya, A.V. ;  
Lysenko, T. Sh. ; Shtegelman, L.A. ; Vilshashkaya, A.V.  
Toxicological characteristics of ampicillin.

Antibiotiki (Moscow), 1975, 20 (7), 653 - 57.

48.- R.A. Veis and I.A. Storozhev.

Pharmacology of ampicillin.

Antibiotiki (Moscow), 1967, 12 (8), 698 - 702.

49.- Vasina, I.G. ; Vasina, T.A. ; Petrova, I.V. ; Polosina, O.V..

Effect of semisynthetic penicillins (ampicillin and  
cabernicillin), on the activity of the sympathoadrenal system

Antibiotiki (Moscow), 1974, 19 (7), 614 - 18.

50.- Benzi, G. ; Berte, F. ; Arrigoni, E. ; Bermudez, E. ;

Sanguinetti, L. ; Crema, A. .

Pharmacodynamic aspects of the action of some semi -  
synthetic penicillins on smooth muscles.

G. Ital. Chemioter., 1970, 14 (1 -4), 107 - 21.

51.- Benzi, G. ; Arrigoni, E. ; Panceri, P. ; Berte, F. -  
Action of gentamicin, aminosidin and ampicillin on  
uterine tone and motility.

Jap. J. Pharmacol., 1972, 22 (4), 571 - 6.

52.- Arrigoni, E. ; Benzi, G. .

Effect of ampicillin on the extrahepatic biliary tract  
I. Effect in vitro on the bile duct and gallblader.

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1968, 44 (19), 1557 - 60.

53.- Arrigoni, E. ; Benzi, G. .

Effect of ampicillin on the extrahepatic bile ducts.

II. In vivo effect on the common bile duct,

Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 1968, 44 (22), 1930 - 3

54.- Iain J. McGilveray and Robert D. Strinckland. .

Detection and separation of penicillins by thin layer  
chromatography.

J.Pharm. Sci., 56 (1), 77 - 9, (1967).

55.- Guven, K.C. ; Ari, A. .

Identification of penicillin derivates by thin layer  
chromatography.

Eczacilik Bul., 1971, 13 (2), 20 - 3.

56.- Autherhoff, H. ; Kienzler, H. .

Identification of the common natural and partial  
synthetic penicillins.

Deut. Apoth.-Ztg., 1972, 112 (8), 297 - 9.

- 57.- Wong, R.T. ; Tsai, Y. H. ; Fush, T. J. .  
Separation and identification of common antibiotics  
by thin layer chromatography.  
Hua. Hsueh., 1972, (1), 13 - 16.
- 58.- Luknarova, N. ; Hamerlikova, O. ; Faith, L. .  
Detection and separation of semisynthetic penicillins  
Cesk. Farm., 1973, 22 (8), 353 - 6.
- 59.- Walsh, Mohamed L. and Hassan, S. M. .  
Characterization of some oral penicillins by TLC  
using metal ions.  
J. Drugs Res., 1973, 5 (1), 111 - 15.
- 60.- Biagi, G.L. ; Barbaro, A.M. ; Gamba, M.F. ; Guerra, M.C.  
Partition data of penicillins determined by means of  
reversed-phase thin layer chromatography.  
J. Chromatogr., 1969, 41 (3 - 4), 371 - 9.
- 61.- Biagi, G.L. ; Barbaro, A.M. ; Guerra, M.C. .  
Influence of pH in buffered reversed-phase thin layer  
chromatography of penicillins and cephalosporins.  
J. Chromatogr., 1970, 51 (3), 548 - 52.
- 62.- Tortolani, G. ; Mazza, M. .  
Chromatography of antibiotics on SP - sephadex.  
J. Chromatogr., 1973, 86 (1), 139 - 44.
- 63.- Hyslop, Newton E. Jr. and Milligan, Richard J. .  
Chromatography of penicillins, penicilloates and  
penicilloylamides on dextran gels.

Antimicrob. Ag. Chemother., 1974, 5 (6), 617 - 29.

64.- J.W.G. Smith ; G.E. de Grey and V.J. Patel. .

The spectrophotometric determination of ampicillin.

Analyst (London), 92 (1093), 247 - 52, (1967).

65.- Davidson, A. G. and Stenlake, J.B. .

Spectrophotometric determination of ampicillin and cloxacillin in combined preparations.

J. Pharm. Pharmacol., 1973, 25 (Suppl.), 156 - 157.

66.- Celletti, P. ; Moretti, G.P. ; Petrangeli, B. .

New methods for the chemical determination of ampicillin and cloxacillin alone or in combination. Adaptation to automatic analysis.

Farmaco, Ed. Prat., 1972, 27 (12), 688 - 98.

67.- Doadrio, Antonio ; Garcia-Mirasierra Gomez, M. .

Spectrophotometric determination of ampicillin as its cooper complex.

An. Real Acad. Farm., 1969, 35 (1), 115 - 31.

68.- Lee, Wang-Kyu ; Yoo, Byung-Tai ; Kang, Gil-Jong. .

Colorimetric determination of drugs with phosphomolybdic acid. I. Colorimetric determination of ampicillin with phosphomolybdic acid.

Yakhak Hoe Chi., 1974, 18 (3), 190 - 6 .

69.- Jusko, William J. .

Fluorometric analysis of ampicillin in biological fluids.

J. Pharm. Sci., 1971, 60 (5), 729 - 32.

70.- Weitkamp, H. ; Barth, R. .

Infrared spectrophotometric as universal method for the quantitative analysis of penicillins.

Arch. Pharm., (Weinheim, Ger.), 1974, 307 (6), 426-37.

71.- G.F.H. Green ; J.E. Page ; Susan E. Staimforth. .

Cephalosporanic acids. I . Infrared absorption and penicillin analogs.

J. Chem. Soc., 1965, (March), 1595 - 1605.

72.- Moll, F. and Doecker, H. .

Condensed azetidiones. I. Determination of ampicillin cephalixin and related compounds by formol titration.

Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.), 1972, 305 (7), 548-53.

73.- Carltsrom, A. ; Dornbush, K. ; Hagelberg, A.; Malmberg, A

Microbiological assay of mixtures of ampicillin and cloxacillin in plasma after separation by high voltage electroforesis.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B., 1974,

82 B (1), 67 - 74.

74.- Sagers, B.A. and Lawson, David. .

Differential attachment of antibiotics to glycoprotein and blood lymphocytes.

J. Clin. Pathol., 1970, 23 (3), 266 - 68.

75.- Adam, Dieter ; Schaffert, Wolfgang ; Marget, Walter. .

Enhanced in vitro phagocytosis of Lysteria monocytogenes by human monocytes in the presence of ampicillin, tetracycline, and chloramphenicol.

Infec. Immunity., 1974, 9 (5), 811 - 14.

76.- Mikaelyan, V.G. ; Kalashyan, K. Kh. ; Gevorkyan, M.I.

Effect of ampicillin and methicillin on the phagocytic activity of leucocytes under experimental conditions.

Tr. Erevan Med. Inst., (USSR), 1974, 16 (1), 243 - 5.

77.- Welch, Henry and Hunter, Albert C. .

Method for determining the effect of chemical anti - sepsis on phagocytosis.

Amer. J. Pub. Health., 1940, 30, 129 - 37. (Feb.).

VI.B.- LIBROS :

- L1.- The Merck Index.  
Eighth Edition.  
Pagina # 75.  
Merck and Co., Inc. .
- L2.- American Medical Asociation.  
Medicamentos Nuevos.  
Primera Edición., 1969.  
Pags. : 363 y 364.  
La Prensa Medica Mexicana.
- L3.- S.S.A. Dirección de Control de Medicamentos.  
Farmacopea Nacional de los E. U. Mexicanos.  
Tercera Edición., 1962.  
Pags. : # 437.
- L4.- Martin, Frobisher y colaboradores.  
Fundamentals of Microbiology.  
Ninth Edition., 1974.  
Cápítulos : 2, 14,23 y 26.  
Pags. : 23,32,114,199,203, 319 - 326,357 - 61.  
W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- L5.- Bernard D. Davis y colaboradores.  
Microbiology.  
Second Edition., 1970.  
Capitulos : 2, 6, 7, 14, 17, 18 y 20.  
Pags. : 24, 107-120, 149, 155-157, 162, 355, 464, 512-  
524, 581-583, 643-645, 649-653, 674.

Harper and Row Publishers.

L6.- Lenhinger Albert L. .

Biochemistry.

Primera Edición., 1972.

Capitulos : 1, 11 y 22.

Pags.: 31,33,35,226,231-237,486,506-509.

Worth Publishers, Inc., N.Y. .

L7.- Stryer Lubert.

Biochemistry.

Primera Edición., 1975.

Capitulo : 31.- Bacterial Cell Walls.

Pags. : 754 - 765.

W.H. Freeman and Company., (San Francisco).

L8.- Thomas D. Brock.

Biología de los microorganismos.

Primera Edición., 1973.

Capitulos : 2, 3, 9, 15 y 18.

Pags. : 34-40,62-66,230,234,245,247,254,417,419,426 -

430, 440,445,448,540-542.

Ediciones Omega S.A. .

L9.- J.H. Humprey and R.G. White.

Inmunology for Students of Medicine.

Third Edition., 1970.

Capitulos : 1 y 2.

Pags. : 9, 10, 54-63.

Blackwell Scientific Publishers., Oxford London.

L10.- Carpenter Philip L. .

Inmunología y Serología.

Primera Edición., 1972.

Capitulos : 11 y 14.

Pags. : 223 - 242 y 341 - 342.

La Prensa Medica Mexicana, México, D.F. .

L11.- Roit, Ivan M. .

Essential Immunology.

Second Edition., 1974.

Capitulos : 1, 2, 5, 6 y 7.

Pags. : 3,4,31,36,94,105,116,124,129,134,136,137, y  
159-162.

Blackwell Scientific Publications., Oxford London.

L12.- Krueguer Robert G. y colaboladores.

Introduction to Microbiology.

Primera Edición., 1973.

Capitulos : 5,y 22.

Pags. : 188 - 192 y 581 - 584.

The Macmillan Company, N.Y. .

L13.- Baltimore Biological Laboratory, Inc. (B.B.L.).

Productos para Laboratorios de Microbiología.

Primera Edición en Español.

Pagina # 104.

L14.- Dan H. Campbell y colaboradores.

Methods in Immunology.

Second Edition., 1970.

Capitulo : Reagents.

Pagina # 435.

W.A. Benjamin, Inc., Publishers.

L15.- Kolmer John A. y colaboradores.

Métodos de Laboratorio.

Quinta Edición., 1960.

Capitulos : 17 y 30.

Pags. : 417 y 746.

Editorial Interamericana.

FIN.



**Impresiones Lupita**

MEDICINA No. 25  
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD  
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.  
TEL. 548-49-79