

Nº 47
2.EJ.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Micrococcus luteus y su aplicación en
la determinación de la potencia de
la ampicilina comercial

TRABAJO ESCRITO

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:

MA. DEL PILAR FLORES MORALES



México, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	2
I. ANTECEDENTES	
i. Generalidades sobre <u>Micrococcus luteus</u>	3
ii. Generalidades sobre la ampicilina	21
II. LA DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE AMPICILINA	
i. Método químico	26
ii. Método biológico	28
CONCLUSIONES	62
BIBLIOGRAFIA	64

INTRODUCCION

La Microbiología representa una de las disciplinas de mayor relevancia dentro de la industria farmacéutica. debido no sólo a los numerosos productos comerciales cuya elaboración es de origen microbiano y al estricto control que se establece diariamente de los diversos contaminantes, sino también a lo cada vez más amplia gama de bioensayos que utilizan microorganismos para comprobar la calidad de los medicamentos y sus respectivas materias primas.

En este sentido, la determinación de la potencia de los antibióticos y la valoración de las vitaminas suelen destacar como los ensayos microbiológicos empleados con mayor frecuencia.

El presente trabajo describe los principales aspectos asociados a la determinación de la potencia de la ampicilina, presentando una estructura que permite revisar su contenido con fines didácticos y/o profesionales.

OBJETIVOS

- Describir las principales características microbiológicas de Micrococcus luteus.
- Mencionar las propiedades farmacológicas más relevantes de la ampicilina.
- Describir la metodología asociada a la determinación de la potencia de la ampicilina, subrayando los cálculos implicados.

I. ANTECEDENTES

i. Generalidades sobre Micrococcus luteus

En la actualidad los micrococcos se encuentran incluidos, junto con los estafilococos y planococos, dentro de la familia Micrococcaceae (1).

Los tres géneros mencionados son cocos Gram positivos, cuya pared celular está formada por un peptidoglucano que contiene L-lisina; no obstante, su contenido guanina-citosina y las pruebas de hibridación en sus ácidos nucleicos indican que no están muy relacionados filogenéticamente (2,3).

Los estafilococos y micrococcos pueden diferenciarse entre sí sobre las siguientes bases:

- a) Producción anaerobia de ácido a partir de glucosa.
- b) Producción de ácido a partir de glicerol y en presencia de 0.4 microgramos de eritromicina por mililitro.

Ambas pruebas son positivas para la mayoría de los estafilococos y negativas para los micrococcos (4,5).

Micrococcus luteus presenta forma de coco con un diámetro que varía entre 0.9 y 1.8 micras; forma tetradas o racimos irregulares, es no capsulado, inmóvil, no esporulado y su reacción a la tinción de Gram es positiva (6). Este microorganismo no se considera exigente en cuanto a sus requerimientos nutricionales, aunque se ha demostrado que es auxótrofo para ácido glutámico, tiamina y biotina (6). Entre los medios de cultivo empleados para lograr su reproducción, se cuenta el agar nutritivo adicionado de 7.5 % de cloruro de sodio, el agar nitrógeno inorgánico (6) y el FTO de Curry y Borovian. Sin embargo, en la industria farmacéutica, el medio con el que más se le relaciona es el agar soya tripticaseína (7). Una vez que se han inoculado las placas, éstas se incuban a 37 grados centígrados durante 24 h y en aerobiosis común, ya que se trata de una bacteria aerobia estricta (6). Las colonias de M. luteus son convexas, con bordes regulares y presentan un pigmento que puede ser amarillo, verde amarillento o naranja, aunque algunas cepas lo producen de color violeta. Cabe señalar que dicho pigmento es un carotenoide (6).

El empleo de reacciones bioquímicas puede considerarse un recurso altamente confiable en su identificación (tabla I) por lo cual a continuación se describen las principales características de las pruebas involucradas (8).

TABLA 1. Características bioquímicas de M. luteus

Prueba	Resultado
Catalasa	+
Hidrólisis de la esculina	-
Hidrólisis de la gelatina	+
Movilidad	-
Oxidasa	+
Oxidación	+
Fermentación	-
Reducción de nitratos	-

Prueba de la catalasa (B)

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aeróbicas y facultativas que contienen sistema de citocromos. Esta enzima es una hemoproteína clasificada como una hidropoxidasa. El peróxido de hidrógeno se forma como producto terminal oxidativo de la descomposición aeróbica de los azúcares, y cuando se acumula es tóxico para las bacterias y provoca su muerte. Por ello, la catalasa descompone al peróxido de hidrógeno, reeditando agua y oxígeno.

Reactivos:

Peróxido de hidrógeno al 30%. Conservarlo en frasco color ámbar, para evitar su exposición a la luz.

Amortiguador de fosfatos pH 7.

fosfato monopotásico anhidro	1.361 g
------------------------------	---------

fosfato disódico anhidro	1.420 g
--------------------------	---------

agua destilada	1 000 ml
----------------	----------

Preparación: Agregar las sales a un pequeño volumen de agua destilada (hervida y enfriada previamente) en un matraz volumétrico de un litro; disolver por agitación y agregar agua destilada hervida c.b.p. 1 000 ml.

Técnica:**Método del portaobjetos**

Con una asa de inoculación recoger el centro de una colonia pura de 18 a 24 h y colocarla sobre un portaobjetos de vidrio limpio.

Agregar una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre el contenido del portaobjetos, usando gotero o pipeta Pasteur.

No se debe invertir el orden del método porque pueden producirse resultados falsos positivos, ni mezclar con el asa de inoculación.

Método en medios sólidos.

Agregar directamente 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3% a un cultivo puro de agar en pico de flauta. La prueba no debe realizarse en cultivos obtenidos en agar sangre.

Interpretación:

Prueba positiva: formación inmediata de burbujas, fácilmente detectables.

Prueba negativa: no hay formación alguna de burbujas, dado que no se genera oxígeno.

Prueba de la hidrólisis de esculina (B).

La esculina es un glucósido o acetal derivado de monosacáridos simples que, como tal, es rápidamente hidrolizado por los ácidos. La base de la prueba es la hidrólisis de esculina a esculetina liberando glucosa. Finalmente, la esculetina reacciona con una sal de hierro para formar un complejo negro.

Medios y Reactivos:

Medio de esculina con bilis

peptona	5 g
extracto de carne	40 g
bilis de buey	1 g
esculina	1 g
citrato de hierro	0.5 g
agar	15 g
agua destilada	1 000 ml.

Preparación. Mezclar y disolver los reactivos repartiendo en tubos de 16 x 150 mm con 5 ml cada uno y esterilizar a 121 grados centígrados, 15 lb, durante 15 minutos. Enfriar inclinando los tubos.

Técnica:

Inocular el medio con un cultivo puro, dejando escurrir 2 gotas a la superficie del pico de flauta con una Pipeta Pasteur; después, incubar a 35 grados centigrados durante 48 h.

Interpretación:

Si hay presencia de un color negro o castaño oscuro en el pico de flauta, la prueba es positiva. Si después de 72 h de incubación no se ha producido ennegrecimiento del medio la prueba es negativa.

Prueba de hidrólisis de la gelatina (B)

Las proteínas son moléculas demasiado grandes para penetrar en la célula bacteriana; por tanto, para que ésta las utilice, antes debe hidrolizarlas. Algunas bacterias producen enzimas proteolíticas que hidrolizan a la gelatina, proteína compleja derivada del colágeno natural. Si se incorpora la gelatina a un medio de cultivo puede detectarse la producción de estas enzimas, que se conocen como gelatinasas.

Medios y Reactivos:**Medio de gelatina nutritiva**

extracto de carne	3 g
peptona	5 g
gelatina	120 g
agua destilada	1 000 ml

La gelatina se deja reposar en el agua 15-30 minutos; después se calienta hasta hervir (50 grados centígrados) para que se disuelva; se agregan el extracto de carne y la peptona, se vuelve a calentar a ebullición y se reparte en tubos de 12 x 75 mm antes de la esterilización a 15 lb durante 15 minutos.

Técnica:

Se siembra el tubo por picadura con un inóculo abundante, hasta 2 a 2.5 cm de profundidad. Incubar a 35 grados centígrados durante 24 h a 14 días.

Interpretación:

Para efectuar la interpretación, se colocan los tubos en el refrigerador o en baño de hielo durante un periodo aproximado de 2 hs para determinar si se ha producido o no la hidrólisis.

La prueba se considera positiva si el medio ha perdido su consistencia sólida.

Prueba de Movilidad (8).

Esta prueba puede efectuarse de diversas maneras; ya sea directamente al microscopio mediante tinciones flagelares o en medios tales como el agar semisólido de SIM. La primera se recomienda cuando las reacciones resulten débiles o dudosas, en cuyo caso se sugiere la técnica de Leifson por su fácil realización -ésta se mencionará más adelante-.

Los flagelos bacterianos se tiñen con soluciones alcohólicas de colorantes como la pararrosanilina que precipitan al evaporarse el solvente. Puede utilizarse fucsina básica (acetato de pararrosanilina) y además ácido tánico como mordiente. Para la visualización de la bacteria, también puede aplicarse un colorante de contraste (azul de metileno).

Reactivos:

Fucsina básica al 1.2% en etanol al 96 %.

Ácido tánico al 3% en agua. Añadir fenol 1:2,000 para conservarlo durante el almacenamiento.

Cloruro de sodio al 1.5% en agua.

Se mezclan las tres soluciones en volúmenes iguales y su pH se ajusta a 5. Puede usarse inmediatamente y, si se desea conservar durante 1 semana, se almacena a temperatura ambiente en un frasco con cierre hermético.

Técnicas:

Se prepara una suspensión bacteriana en agua con un cultivo joven (24-48 h) obtenido en medios libres de hidratos de carbono, pues los pH ácidos inhiben la formación de flagelos.

Se colocan dos gotas de suspensión en el extremo de un portaobjetos lavado con ácido (HCl al 30% en alcohol etílico de 96 grados) y se dejan secar al aire. Posteriormente, el portaobjetos se coloca en un plano inclinado, se cubre con una película fina de colorante y se deja durante 5 a 15 minutos para que se evapore el alcohol. Cuando se forma un precipitado, se enjuaga el portaobjetos con agua destilada y se deja secar al aire.

Interpretación:

Se observa al microscopio con el objetivo de inmersión: los flagelos se observan de un color rojo a negro-azulado.

Tratándose de microorganismos aerobios estrictos, no se recomienda el agar semisólido utilizado para bacterias fermentadoras, debido a que los primeros solamente desarrollan en la superficie. Sin embargo, cuando se emplea este medio, la picadura debe efectuarse abarcando los 4 mm superiores y la lectura se realiza durante las 4 a 6 h siguientes, ya que muchas cepas móviles -aerobios estrictos- sólo exhiben tempranamente una tenue turbidez que tiende a desaparecer mediante incubación prolongada.

Prueba de la oxidasa (8).

La enzima citocromo oxidasa es una hemoproteína presente en microorganismos aerobios y facultativos, que permite a éstos utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. El objetivo de esta prueba consiste en determinar si dicha enzima es capaz de habilitar a las aminas aromáticas primarias, tales como el diclorhidrato de p-fenilendiamina, para que actúen como aceptores de electrones. Es decir, en presencia de oxígeno, la citocromo oxidasa de ciertas bacterias oxida al reactivo utilizado, transformándolo en indofenol o azul de indofenol, los cuales son compuestos coloridos.

Reactivos:

Reactivo de Kovac para oxidasa: Diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1% en agua.

Reactivo de Gordon y McLeod: Diclorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina al 1-1.5% en agua.

Reactivo de Nedi: Una mezcla en partes iguales de alfa naftol al 1% en alcohol etílico de 95 y aminodimetilanilina al 1%.

Técnica:

Directamente en la placa, se agregan 2 ó 3 gotas de cualquiera de los reactivos señalados sobre la colonia sospechosa. El color correspondiente aparecerá durante los 10 a 15 segundos posteriores.

También se puede realizar de la siguiente manera: en un trozo de papel filtro Whatman se agregan unas gotas se reactivo de Kovac; posteriormente, con un asa se extiende la colonia sobre él. La coloración esperada se observará 10 a 30 segundos después.

Interpretación:

Las colonias que manifiestan resultado positivo desarrollarán un color rosado, después marrón y finalmente negro. Si se emplea la mezcla dimetil-p-fenilendiamina/alfa-naftol, se presenta reacción positiva por la aparición de un color azul. Las colonias del microorganismos oxidasa negativo no evidenciarán cambio de color.

Prueba de oxidación-fermentación (8).

Es de todos conocido, que una bacteria utiliza los carbohidratos por oxidación o por fermentación; esto depende, en gran parte, de que el metabolismo del microorganismo sea aerobio o anaerobio. Hay microorganismos que pueden desarrollar en ambas condiciones y éstos son los facultativos.

La fermentación es un proceso anaerobio y los fermentadores de carbohidratos son generalmente anaerobios y facultativos. El ciclo fermentativo principal de la glucosa es el ciclo de Embden-Meyerhof, aún cuando puede producirse la degradación por el ciclo de las pentosas o por el de Entner-Doudoroff. Sin embargo, los tres ciclos requieren de fosforilación a nivel de sustrato como paso inicial, antes de la degradación. Por este proceso la glucosa es degradada en dos

moléculas de triosa, siendo el intermediario clave el ácido pirúvico.

La oxidación de glucosa es un proceso aerobio realizado por las bacterias aerobias estrictas. La glucosa no es degradada o desdoblada en dos moléculas de triosa; por el contrario, el grupo aldehído es oxidado directamente en grupo carboxilo formando ácido gluconico que es, a su vez, oxidado a ácido 2-cetogluconico que puede ser degradado en dos moléculas de ácido pirúvico. La fosforilación en este proceso no es inicial debido a la incapacidad del ATP de penetrar en la célula bacteriana.

La degradación de carbohidratos, por cualquiera de las vías mencionadas anteriormente, reditua ácidos como producto final, mismos que son excretados al medio y que se pueden detectar con un indicador de pH que virará su color.

Medios y Reactivos:

Medio básico O/F de Hugh & Leifson

peptona	2 g
cloruro de sodio	5 g
fosfato dipotásico	0.3 g
agar	2-3 g
azul de bromotimol	0.03-0.08 g

agua destilada 1.000 ml
soluciones acuosas al 1% de cada carbohidrato.

Mezclar y disolver los reactivos y esterilizar a 121 grados centigrados, 15 lb durante 15 minutos, enfriar a 40-45 grados centigrados y agregar en condiciones asépticas los carbohidratos ya esterilizados por medio de filtración. Repartir en tubos estériles con tapa de rosca. Enfriar en posición vertical.

Técnica:

Se inocula con una asada de cultivo de la bacteria a estudiar, hasta cuatro veces, puncionando 1.3 cm por debajo de la superficie. Se incuban a 35 grados centigrados durante 48 h o más.

Interpretación:

Al presentarse producción de ácido se observa un cambio de color en el medio. Consultar tabla 2.

Tabla 2. Interpretación de los resultados de oxidación-Fermentación (B).

O/F	Tubo con reacción	Tubo abierto	Tubo sellado
Oxidación (A)	Abierto	Amarillo (A)	Verde (-)
Fermentación (anaerogénica)	Sellado	Amarillo (A)	Amarillo (A)
Fermentación (aerogénica)	Sellado	Amarillo (AG)	Amarillo (AG)
Ni Fermentación ni oxidación	Ninguno	Azul o Verde (-)	Verde (-)
Fermentación y Oxidación	Ambos	Amarillo (A o AG)	Amarillo (A o AG)

A = Acido

AG = Acido y gas

Prueba de reducción de nitratos (B)

La reducción de nitrato, ya sea a nitrito o a gas nitrógeno, tiene lugar en condiciones anaeróbicas. La mayoría de las bacterias aeróbicas son facultativas y sólo reducen al nitrato en ausencia de oxígeno. La reducción del nitrato tiene diferentes productos finales dependiendo de la especie bacteriana, destacando: nitritos, amoníaco, nitrógeno molecular, óxido nítrico, óxido nítrico o hidroxilamina. Estos productos ya no son asimilados por la célula que los excreta al medio circundante y sirven para detectar si hubo reducción o no, por medio de dos reactivos: ácido sulfanílico y alfa-naftilamina. Bajo estas condiciones se forma un compuesto diazótico p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina que es colorido e indica la presencia de los productos mencionados.

Medios y Reactivos:

Caldo con nitrato

extracto de carne	3 g
peptona	5 g
nitrato de potasio	1 g
agua destilada	1 000 ml

Agar con nitrato	
caldo con nitrato	1 000 ml
agar	12 g

Reactivo A

alfa-naftilamina	5 g
ácido acético al 30%	1 000 ml

Reactivo B

ácido sulfanílico	8 g
ácido acético al 30%	1 000 ml

Mezclar y disolver los componentes. Repartir el caldo y el agar en tubos y esterilizar a 121 grados centígrados, 15 lb durante 15 minutos. El agar se deja solidificar en pico de flauta.

Técnica:

Inocular el caldo con una asada de cultivo puro del microorganismo; el agar se estria y se punciona. Ambos se incuban a 35 grados centígrados de 12 a 24h y, después de la incubación, se añaden los reactivos A y B. Si la reacción es negativa, añadir un poco de Zn (20 mg) exento de nitratos o nitritos y observar si se produce o no color en 30 seg.

Interpretación:

Si aparece un color rojo dentro de los 30 seg posteriores a la adición de los reactivos A y B, hay presencia de nitrito y la reacción será positiva.

Si no se desarrolla color hay que agregar el Zn mencionado y si aún después no aparece color, entonces significa que el microorganismo redujo el nitrato a nitrito, pero inmediatamente después redujo también a este último; si aparece un color rojo intenso, se deberá a la presencia de nitratos no reducidos y, por lo tanto la reacción se considera negativa, ya que fue el zinc el que redujo a dicho nitrato.

ii. Generalidades sobre la ampicilina**Nombre químico:**

6-((aminofenilacetil)amino)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo(3,2,0)heptano-2-carboxílico.

Fórmula:

C H N O S
16 19 3 4

PM: 349.4

Interpretación:

Si aparece un color rojo dentro de los 30 seg posteriores a la adición de los reactivos A y B, hay presencia de nitrito y la reacción será positiva.

Si no se desarrolla color hay que agregar el Zn mencionado y si aún después no aparece color, entonces significa que el microorganismo redujo el nitrato a nitrito, pero inmediatamente después redujo también a este último; si aparece un color rojo intenso, se deberá a la presencia de nitratos no reducidos y, por lo tanto la reacción se considera negativa, ya que fue el zinc el que redujo a dicho nitrato.

ii. Generalidades sobre la ampicilina**Nombre químico:**

6-((aminofenilacetil)amino)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo(3,2,0)heptano-2-carboxílico.

Fórmula:

C H N O S
16 19 3 4

PM: 349.4

Descripción: Polvo cristalino blanco, inodoro, sabor amargo.

Solubilidad: Soluble en agua y prácticamente insoluble en etanol, cloroformo, éter, acetona y aceites (10).

Mecanismo de acción: Se considera bactericida porque inhibe la síntesis de la pared celular durante la multiplicación activa (10).

Propiedades farmacológicas: La ampicilina es estable en medio ácido y se absorbe bien en el intestino, previa administración oral. Una dosis oral de 0.5 g produce concentraciones plasmáticas máximas de aproximadamente 3 microgramos/ml a las 2 horas. La droga es detectable en el plasma durante las cuatro horas posteriores a una dosis oral convencional. La ingestión de alimentos antes de la administración hace menos completa su absorción. La inyección intramuscular de 0.5 o 1 g de ampicilina sodica reditúa concentraciones plasmáticas máximas de 7 a 10 microgramos/ml, mismas que declinan exponencialmente en un tiempo medio aproximado de 80 minutos. La mitad de una dosis oral se depura en el riñón durante las primeras 6 horas que siguen a la ingestión. A diferencia de lo anterior, el 80 % de las dosis intramusculares o intravenosas de 500 mg se elimina por la orina en ese tiempo. El deterioro renal severo prolonga marcadamente la persistencia de la ampicilina en el plasma.

La diálisis peritoneal es ineficaz para eliminar la droga de la sangre, pero la hemodiálisis elimina aproximadamente el 40 % de la reserva corporal en 7 horas. La ampicilina aparece en la bilis, experimenta circulación enterohepática y se excreta en cantidades apreciables por las heces; su concentración biliar depende notablemente de la integridad de la vesícula biliar y sus conductos, y cuando el conducto biliar común está obstruido, la ampicilina no es detectable en la bilis. Otras características de este antibiótico son: buena tolerancia gastrointestinal, resistencia a la acidez gástrica, rápida absorción en las porciones altas del intestino y pronta difusión tisular (11,12,13)

Indicaciones: Su empleo es recomendable para tratar enfermedades de las vías urinarias, respiratorias, digestivas y biliares, así como procesos locales o generalizados que no responden suficientemente a otros antibióticos (cloranfenicol, tetraciclinas), especialmente cuando se encuentran involucradas bacterias tales como los enterococos, Proteus, Salmonella y E. coli. Su acción también es efectiva en diversas afecciones bucales y en extracciones dentales infectadas.

Efectos secundarios: Puede ocasionar algunos efectos relativamente frecuentes como la tromboflebitis (en aplicaciones endovenosas), reacciones cutáneas (morbiliformes, eritema, etc.) y algunos trastornos gastrointestinales. Entre los efectos que se presentan con escasa frecuencia destacan las alteraciones de la función hepática y las hematológicas, fiebre medicamentosa, nefritis intersticial aguda, reacciones anafilácticas -incluyendo choque-, convulsiones -en cuyo caso debe reducirse la dosis-, etc. Cuando se sospecha de colitis pseudomembranosa (diarrea grave persistente), la medicación debe suspenderse de inmediato (14).

Dosificación media: Va a depender de la edad; para adultos y niños en edad escolar: 1 a 2 cápsulas de 500 mg cada 6 a 8 horas; por vías intramuscular o endovenosa: 250 a 500 mg en inyección lenta o con venoclisis, cada 6 h. En los niños pequeños y lactantes es conveniente calcular la dosis -a razón de 50 a 200 mg por Kg de peso- y fraccionarla en varias tomas al día. En cuanto al uso de suspensiones en los pacientes de hasta un año de edad 1 cucharadita 4 veces al día del producto para lactantes y, de 1 a 3 años de edad, 2 cucharaditas 4 veces por día de la de la suspensión para niños(14).

Presentaciones comerciales:

Cápsulas: Con 250 y 500 mg.

Comprimidos: 1 000 mg.

Suspensión: Para lactantes 1.6 g/60 ml y, para niños, 3.0 g/60 ml.

Inyectables: frascos ampula con 250 mg y una ampolleta de 2 ml de agua inyectable esterilizada; frascos ampula con 500 mg y una ampolleta de 5 ml de agua inyectable esterilizada; frascos ampula con 1 gramo y una ampolleta de 10 ml de agua inyectable esterilizada (14).

II. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE AMPICILINA

Para determinar la concentración de ampicilina en un medicamento se dispone de métodos químicos y microbiológicos. A continuación se hace referencia a los más utilizados.

i. Método químico

En este rubro, el más empleado corresponde a una valoración yodométrica basada en la inactivación de las penicilinas por rompimiento hidrolítico del anillo beta-lactámico, utilizándose a un álcali como catalizador. Bajo estas condiciones, el producto resultante es el ácido peniciloico, el cual es capaz de consumir yodo (9).

La mencionada valoración yodométrica se realiza de la siguiente manera: a 2 ml de la solución de la muestra y del estándar de referencia se les adicionan 2 ml de solución 1 N de hidróxido de sodio, procediéndose a mezclarlos mediante agitación y a dejarlos reposar durante 15 minutos. A continuación se incorpora a cada uno de los matraces 2 ml de ácido clorhídrico 1.2 N y 10 ml de yodo 0.01 N, inmediatamente después se les coloca un tapón y se les permite reposar durante 15 minutos antes de titularlos con solución 0.01 N de tiosulfato de sodio.

Para visualizar el punto final se adiciona a cada matraz una gota de solución de almidón yodurada y se continúa la titulación hasta que el color azul desaparece.

Para efectuar la determinación del blanco, se añaden 10 ml de solución 0.01 N de yodo a un matraz que contenga 2.0 ml de la solución de referencia, se incorporan 0.1 ml de ácido clorhídrico 1.2 N y se titula de inmediato con tiosulfato de sodio 0.01 N. Para detectar el punto final, se adiciona a dicho matraz una gota de almidón yodurado y se prosigue con la titulación hasta la desaparición del color azul. Esta misma técnica debe emplearse para tratar un matraz que contenga 2.0 ml de la solución de la muestra preparada. El cálculo de los microgramos equivalentes (F) a cada ml de solución 0.01 N de tiosulfato de sodio consumido por la solución de referencia, se realiza aplicando la fórmula:

$$(2CP)/(B-1)$$

en donde C es la concentración en mg por ml de la solución de referencia; P es la potencia de la sustancia de referencia en microgramos por miligramo; B es el volumen en

ml de la solución 0.01 N de tiosulfato de sodio consumido en la determinación del blanco; I es el volumen en mililitros de tiosulfato de sodio 0.01 N consumido en la titulación e inactivación (9).

ii. Método biológico

Por lo que se refiere a la determinación de la potencia, al método se le considera específicamente un ensayo biológico cuantitativo, que resulta incluso semejante a los métodos de análisis químicos cuantitativos, en el sentido que se obtiene un valor numérico (en microgramos/miligramo) que mide la actividad del antibiótico en contra de un microorganismo determinado. Este ensayo biológico permite determinar la concentración de ampicilina como materia prima, en producto a granel y en producto terminado. Es decir, establece la concentración de ese antimicrobiano en un medicamento, midiendo la actividad de este último en un sistema biológico (9). La ventaja del ensayo radica en su capacidad para dar a conocer la concentración de la ampicilina sin necesidad de separar el principio activo del conjunto de excipientes que constituyen al medicamento.

Lógicamente, en los ensayos biológicos, el empleo de seres vivos no origina respuestas necesariamente iguales, por lo que se requiere aplicar métodos estadísticos para obtener la mejor estimación de la potencia (10).

Fundamento del método biológico

La susceptibilidad bacteriana a los antibióticos puede medirse in vitro, utilizándose los principios de la difusión en agar. De esta manera, se pueden obtener resultados razonablemente exactos y precisos, siempre que todos los detalles del procedimiento se controlen cuidadosamente. Por lo regular, los antibióticos se adicionan a las placas de prueba, en el interior de penicilindros de acero inoxidable previamente colocados; así, el principio activo que se encuentra en solución migra a través del agar, obteniéndose un gradiente cuyo diámetro depende de la concentración del antibiótico. En otras palabras, la difusión de este último produce una zona de inhibición microbiana, relacionada directamente con la concentración del principio activo. En cuanto al microorganismo empleado, después de una demora inicial (fase lag), se instala una fase de crecimiento logarítmico; en ese momento, la multiplicación bacteriana es más rápida que la difusión de la droga y las células no

inhibidas por el antibiótico continuarán multiplicándose hasta que pueda visualizarse una capa de crecimiento. De esta manera, no aparecerá crecimiento alguno en el área donde la droga haya alcanzado concentraciones inhibitorias; lógicamente, cuanto más susceptible sea el microorganismo, mayor será la zona de inhibición. Cabe señalar que los microorganismos con tiempos de crecimiento prolongados parecerán más susceptibles a los antimicrobianos porque éstos tendrán mayor tiempo para difundir. El tamaño de la zona de inhibición dependerá también de la velocidad de difusión de las drogas, debido a que sus diferentes estructuras químicas y sus respectivos pesos moleculares manifiestan relaciones inversas respecto a su migración; como consecuencia, cada antimicrobiano dará lugar a diferentes patrones durante la interpretación (15,16,17,18,19).

Determinación de la potencia de la ampicilina

La potencia de los antibióticos se determina estableciendo la dosis a la cual se inhibe el crecimiento de un microorganismo susceptible previamente determinado.

La detección de una reducción en la actividad antimicrobiana aporta valores más representativos que los obtenidos mediante métodos químicos. Las técnicas microbiológicas utilizan generalmente un patrón de referencia para resolver dudas con respecto a una posible pérdida de la actividad en los fármacos y cuentan con una notable aceptación en cuanto a precisión y confiabilidad, siempre que se basen en un adecuado diseño experimental; en las pruebas cilindro-placa, las lecturas se restringen a obtener las medidas del diámetro de las zonas de inhibición dentro de las placas. La prueba recomendada contempla la elaboración de una curva de referencia que debe contener 5 ó más diluciones del estándar secundario de ampicilina, incluyendo a una -denominada P3- que equivale en forma estimativa a la dosis de la muestra a la cual se le determinará posteriormente la potencia. Las pruebas microbiológicas de potencia están sujetas a variables intra-pruebas e inter-pruebas, por lo que es recomendable efectuar 2 ó más determinaciones independientes para lograr datos reales sobre la potencia de la muestra por analizar (20,21,22,23,24).

La potencia de la ampicilina se reporta en "Unidades" o microgramos de actividad, establecidos de acuerdo al patrón

primario correspondiente a dicho antibiótico, el cual posee una concentración certificada y se adquiere comercialmente. Cabe señalar que las muestras por analizar se valoran empleándose estándares secundarios por resultar incosteable la utilización rutinaria de estándares primarios.

La concentración del estándar secundario de ampicilina se calcula considerando como referencia al estándar primario del mismo antibiótico. El concepto de microgramos de actividad es posible, debido a que la preparación antibiótica seleccionada como estándar primario (de referencia) consta en su totalidad de una sola entidad química (20,21,22,23,24).

Descripción del método

a. Material para la prueba

Cajas petri de vidrio o plástico de 20 x 100 mm, con tapas de material poroso. Cilindros de acero inoxidable o porcelana con diámetro externo de 8 mm, diámetro interno de 6 mm y longitud de 10 mm, todos los cuales deben estar perfectamente limpios y sin residuos; es

recomendable darles periódicamente un baño con solución 2N de ácido nítrico o ácido crómico.

b. Recomendaciones

El equipo debe encontrarse limpio y el material de vidrio para manejo, transferencia y desarrollo del microorganismo debe esterilizarse mediante calor seco o calor húmedo, según sea el caso. La temperatura de incubación debe controlarse para que sea uniforme. Es conveniente que el espectrofotómetro empleado permita cambios en la longitud de onda de la fuente luminosa, o bien, que se le pueda adaptar un filtro a 580 nm; el blanco se debe ajustar en absorbancia cero, con caldo nutritivo no inoculado.

c. Preparación del inóculo

Lavar con 3 ml de solución salina isotónica estéril el desarrollo de un cultivo de 24 h de Micrococcus luteus ATCC 9341 -obtenido en tubo inclinado con medio para antibiótico No. 1- y distribuirlo en la superficie de un frasco de Roux que contenga 250 ml del medio mencionado. Incubar dicho frasco a 32-35 grados centígrados durante 24 h y recoger el desarrollo bacteriano con 50 ml de solución salina isotónica estéril.

d. Estandarización de la suspensión bacteriana

Determinar la dilución de la suspensión bacteriana que registre el 25% de transmitancia a 580 nm, usando un espectrofotómetro adecuado. Adicionar 0.5 ml del inóculo estandarizado a un matraz con 100 ml del medio antibiótico No. 1 que debe encontrarse aproximadamente a 45 grados centígrados.

e. Preparación del estándar secundario de ampicilina

Pesar una cantidad exacta de estándar secundario de ampicilina y disolverlo en agua destilada para obtener la concentración requerida. Esta solución puede almacenarse en refrigeración durante una semana y, el día de la prueba, preparar a partir de ella las 5 diluciones necesarias para obtener la curva de referencia. Cabe mencionar que el diluyente para estas 5 diluciones es una solución amortiguadora, la cual se prepara disolviendo 16.73 g de fosfato dibásico de potasio y 0.523 g de fosfato monobásico de potasio en 1 000 ml de agua destilada y ajustando su pH a 9.8 más/menos 0.1.

f. Preparación de la muestra por analizar

Con base en el dato teórico de la concentración que posee la muestra por analizar, se prepara una dilución (M3) cuya concentración sea equivalente a P3, empleándose el mismo diluyente que se utiliza para preparar la curva de referencia.

g. Procedimiento

A cada una de las 15 cajas petri, adicionar 21 ml de medio No. 1 y dejar que solidifique sobre una superficie lisa y nivelada. Añadir en forma uniforme 4 ml de medio No.1 previamente inoculado -para formar la capa siembra- y dejar solidificar. Colocar 6 cilindros sobre la superficie de cada una de las 15 cajas, utilizando un colocador de cilindros o algún otro sistema que asegure un espacio suficiente para que no se superpongan los halos de inhibición que ocurrirán posteriormente; llenar por triplicado los cilindros de cada caja, con 2 de las 5 diluciones correspondientes a la curva de referencia (P1, P2, P3, P4, P5) o con sólo una de éstas y la dilución de la muestra (M3), tal como se indica a continuación:

Tabla 3

Bloque	Número de las cajas	Soluciones alternadas
1	1, 2, y 3	P1/P3
2	4, 5, y 6	P2/P3
3	7, 8, y 9	P4/P3
4	10, 11, y 12	P5/P3
5	13, 14, y 15	M3/P3

Incubar las cajas a 32-35 grados centígrados, durante 16-18 h. Retirar los cilindros, medir y anotar los diámetros de cada zona de inhibición -con una aproximación de 0.1 mm- y proceder a realizar los cálculos correspondientes.

Cálculos

Los cálculos de la potencia de la ampicilina se basan en la construcción de una curva de calibración con 5 dosis, y la posterior interpolación -en ella- de los datos obtenidos con la muestra. Este procedimiento se conoce en Estadística como 5+1 y consiste en un diseño de bloques incompleto y desbalanceado, cuyas características son las siguientes:

Las 15 placas inoculadas, abarcan un total de 6 tratamientos: 5 niveles de dosis de la sustancia de referencia (estándar secundario de ampicilina) P1, P2, P3, P4 y P5, igualmente espaciadas en escala logarítmica ($\log d5/d4 = \log d4/d3 = \log d3/d2 = \log d2/d1$) y 1 nivel de dosis correspondiente a la muestra (M3), el cual equivale en forma estimativa a la dosis intermedia de la sustancia de referencia (P3).

Cada caja de un mismo bloque contiene por triplicado, tanto a la dosis intermedia (P3), como a alguna de las siguientes soluciones: P1, P2, P4, P5 y M3 (25).

Procedimiento:

Con el objeto de que los cálculos involucrados resulten más comprensibles, se encuentra contemplado un ejemplo en el que se han empleado dosis (concentraciones) y diámetros de halos de inhibición, correspondientes ambos a valores con los que se trabajó experimentalmente en una determinación efectuada a una ampicilina trihidratada cuya potencia, proporcionada por el proveedor, fue de 889.2 mcg/mg.

Dosis	Concentraciones
P1 = dosis 1	
P2 = dosis 2	
P3 = dosis 3	
P4 = dosis 4	
P5 = dosis 5	
M3 = muestra a dosis 3	0.100 mcg/ml †

Sustitución según el ejemplo contemplado:

Dosis	Concentraciones del ejemplo
P1 = dosis 1	0.064 mcg/ml
P2 = dosis 2	0.080 mcg/ml
P3 = dosis 3	0.100 mcg/ml
P4 = dosis 4	0.125 mcg/ml
P5 = dosis 5	0.156 mcg/ml
M3 = muestra a dosis 3	0.100 mcg/ml †

† Concentración a la que se llevó la muestra original, al diluir 10,000 veces una solución inicial que contenía 1 mg/ml.

A continuación se construye la tabla siguiente con los diámetros de inhibición que se hayan obtenido experimentalmente; los valores de esta tabla corresponden a los halos que ocurrieron en el ejemplo contemplado.

Caja de Petri	1		2		3	
Dilución	P1	P3	P1	P3	P1	P3
Diámetros	14.9	16.1	14.5	16.0	14.0	15.7
**	13.9	15.6	14.0	15.9	14.2	15.7
**	13.8	15.8	14.6	16.2	14.2	15.8

Caja de Petri	4		5		6	
Dilución	P2	P3	P2	P3	P2	P3
Diámetros	14.9	15.8	14.8	15.7	15.1	15.7
**	15.1	15.6	14.8	15.5	15.0	15.4
**	14.7	15.5	15.2	15.6	14.2	15.3

Caja de Petri	7		8		9	
Dilución	P4	P3	P4	P3	P4	P3
Diámetros	16.4	15.6	16.7	15.8	17.1	16.1
**	16.8	15.8	16.4	15.6	16.3	15.7
**	16.5	16.0	16.2	15.7	16.7	15.8

Caja de Petri	10		11		12	
Dilución	P5	P3	P5	P3	P5	P3
Diámetros	17.3	15.6	17.3	15.6	17.3	15.9
**	17.0	15.6	17.5	15.7	17.2	15.8
**	16.9	15.5	17.1	15.5	16.6	15.8

Caja de Petri	13		14		15	
	M3	P3	M3	P3	M3	P3
Dilución						
Diámetros	15.3	15.7	15.9	15.9	15.2	15.5
**	15.8	15.8	15.7	15.7	15.4	15.8
**	15.7	15.7	15.5	15.7	14.9	15.3

** Diámetros de los halos de inhibición correspondientes al ejemplo contemplado.

b) Cálculos iniciales

Los datos anteriores se registran en el siguiente formato, que incluye 15 secciones -correspondientes a las 15 cajas de Petri utilizadas- y se procede a efectuar los cálculos indicados en cada una de ellas. Los números que suceden a la Y significan: el primero, la dosis de aplicación (P1, P2, P3, P4, P5, M3); el segundo, el número de la caja (1 a 15) y, el tercero, el número del penicilindro.

bloque 1	P1	P3	Diferencia
	Y1,1,1	Y3,1,1	d11 = Y111 - Y31
	Y1,1,2	Y3,1,2	d12 = Y112 - Y31
	Y1,1,3	Y3,1,3	d13 = Y113 - Y31

$$Y3,1 = \frac{Y311 + Y312 + Y313}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P1	P3	Diferencia
14.7	16.1	d11 = -1.2
13.9	15.6	d12 = -1.7
13.8	15.8	d13 = -2.0

$$= \frac{16.1 + 15.6 + 15.8}{3} = 15.833$$

3

bloque 1	P1	P3	Diferencia
	$Y_{1,2,1}$	$Y_{3,2,1}$	$d_{14} = Y_{121} - Y_{32}$
	$Y_{1,2,2}$	$Y_{3,2,2}$	$d_{15} = Y_{122} - Y_{32}$
	$Y_{1,2,3}$	$Y_{3,2,3}$	$d_{16} = Y_{123} - Y_{32}$

$$Y_{3,2} = \frac{Y_{321} + Y_{322} + Y_{323}}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P1	P3	Diferencia
14.5	16.0	$d_{14} = -1.5$
14.0	15.9	$d_{15} = -1.9$
14.6	16.2	$d_{16} = -1.6$

$$= \frac{16.0 + 15.9 + 16.2}{3} = 16.033$$

3

bloque 1	P1	P3	Diferencia
	<u>Y1,3,1</u>	<u>Y3,3,1</u>	<u>d17 = Y131 - Y33</u>
	Y1,3,2	Y3,3,2	d18 = Y132 - Y33
	Y1,3,3	Y3,3,3	d19 = Y133 - Y33

$$Y3,3 = \frac{Y331 + Y332 + Y333}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P1	P3	Diferencia
<u>14.0</u>	<u>15.7</u>	<u>d17 = - 1.7</u>
14.2	15.7	d18 = - 1.5
14.2	15.8	d19 = - 1.6

$$= \frac{15.7 + 15.7 + 15.8}{3} = 15.733$$

3

bloque 2	P2	P3	Diferencia
	Y2,4,1	Y3,4,1	d21 = Y241 - Y34
	Y2,4,2	Y3,4,2	d22 = Y242 - Y34
	Y2,4,3	Y3,4,3	d23 = Y243 - Y34

$$Y3,4 = Y341 + Y342 + Y343$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P2	P3	Diferencia
14.9	15.8	d21 = - 0.9
15.1	15.6	d22 = - 0.5
14.7	15.5	d23 = - 0.8

$$= \frac{15.8 + 15.6 + 15.5}{3} = 15.633$$

3

bloque 2	P2	P3	Diferencia
	Y2,5,1	Y3,5,1	d24 = Y251 - Y35
	Y2,5,2	Y3,5,2	d25 = Y252 - Y35
	Y2,5,3	Y3,5,3	d26 = Y253 - Y35

$$Y3,5 = \frac{Y351 + Y352 + Y353}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P2	P3	Diferencia
14.8	15.7	d24 = - 0.900
14.8	15.5	d25 = - 0.700
15.2	15.6	d26 = - 0.400

$$= \frac{15.7 + 15.5 + 15.6}{3} = 15.600$$

3

bloque 2	P2	P3	Diferencia
	Y2,6,1	Y3,6,1	d27 = Y261 - Y36
	Y2,6,2	Y3,6,2	d28 = Y262 - Y36
	Y2,6,3	Y3,6,3	d29 = Y263 - Y36

$$Y_{3,6} = \frac{Y_{361} + Y_{362} + Y_{363}}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P2	P3	Diferencia
15.1	15.7	d27 = - 0.6
15.0	15.4	d28 = - 0.4
14.2	15.3	d29 = - 1.1

$$= \frac{15.7 + 15.4 + 15.3}{3} = 15.467$$

3

bloque 3	P4	P3	Diferencia
	Y4,7,1	Y3,7,1	d41 = Y471 - Y37
	Y4,7,2	Y3,7,2	d42 = Y472 - Y37
	Y4,7,3	Y3,7,3	d43 = Y473 - Y37

$$Y_{3,7} = Y_{371} + Y_{372} + Y_{373}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P4	P3	Diferencia
16.4	15.6	d41 = 0.800
16.8	15.8	d42 = 1.000
16.5	16.0	d43 = 0.500

$$= \frac{15.6 + 15.8 + 16.0}{3} = 15.800$$

3

bloque 3	P4	P3	Diferencia
	Y4,8,1,	Y3,8,1	d44 = Y481 - Y38
	Y4,8,2,	Y3,8,2	d45 = Y482 - Y38
	Y4,8,3,	Y3,8,3	d46 = Y483 - Y38

$$Y3,8 = \frac{Y381 + Y382 + Y383}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P4	P3	Diferencia
16.7	15.8	d44 = 0.900
16.4	15.6	d45 = 0.800
16.2	15.7	d46 = 0.500

$$= \frac{15.8 + 15.6 + 15.7}{3} = 15.700$$

3

bloque 3	P4	P3	Diferencia
	<u>Y4,9,1</u>	<u>Y3,9,1</u>	<u>d47 = Y491 - Y39</u>
	Y4,9,2	Y3,9,2	d48 = Y492 - Y39
	Y4,9,3	Y3,9,3	d49 = Y493 - Y39

$$Y3,9 = Y391 + Y392 + Y393$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P4	P3	Diferencia
<u>17.1</u>	<u>16.1</u>	<u>d47 = 1.0</u>
16.3	15.7	d48 = 0.6
16.7	15.8	d49 = 0.9

$$= \frac{16.1 + 15.7 + 15.8}{3} = 15.867$$

3

bloque 4	P5	P3	Diferencia
	Y5,10,1	Y3,10,1	d51 = Y5101 - Y310
	Y5,10,2	Y3,10,2	d52 = Y5102 - Y310
	Y5,10,3	Y3,10,3	d53 = Y5103 - Y310

$$Y3,10 = Y3101 + Y3102 + Y3103$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P5	P3	Diferencia
17.3	15.6	d51 = 1.7
17.0	15.6	d52 = 1.4
16.9	15.5	d53 = 1.4

$$= \frac{15.6 + 15.6 + 15.5}{3} = 15.567$$

3

bloque 4	P5	P3	Diferencia
	Y5,11,1	Y3,11,1	d54 = Y5111 - Y311
	Y5,11,2	Y3,11,2	d55 = Y5112 - Y311
	Y5,11,3	Y3,11,3	d56 = Y5113 - Y311

$$Y3,11 = Y3118 + Y3112 + Y3113$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P5	P3	Diferencia
17.3	15.6	d54 = 1.700
17.5	15.7	d55 = 1.800
17.1	15.5	d56 = 1.600

$$= \frac{15.6 + 15.7 + 15.5}{3} = 15.6$$

3

bloque 4	P5	P3	Diferencia
	Y5,12,1	Y3,12,1	d57 = Y5121 - Y312
	Y5,12,2	Y3,12,2	d58 = Y5122 - Y312
	Y5,12,3	Y3,12,3	d59 = Y5123 - Y312

$$Y_{3,12} = \frac{Y_{3121} + Y_{3122} + Y_{3123}}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

P5	P3	Diferencia
17.3	15.9	d57 = 1.4
17.2	15.8	d58 = 1.4
16.6	15.8	d59 = 0.8

$$= \frac{15.9 + 15.8 + 15.8}{3} = 15.833$$

3

bloque 5	M3	P3	Diferencia
	Y3,13,1	Y3,13,1	d31 = Y3131 - Y313
	Y3,13,2	Y3,13,2	d32 = Y3132 - Y313
	Y3,13,3	Y3,13,3	d33 = Y3133 - Y313

$$Y3,13 = Y3131 + Y3132 + Y3133$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

M3	P3	Diferencia
15.3	15.7	d31 = - 0.4
15.8	15.8	d32 = 0.0
15.7	15.7	d33 = 0.0

$$= \frac{15.7 + 15.8 + 15.7}{3} = 15.733$$

3

bloque 5	M3	P3	Diferencia
	Y3,14,1	Y3,14,1	d34 = Y3141 - Y314
	Y3,14,2	Y3,14,2	d35 = Y3142 - Y314
	Y3,14,3	Y3,14,3	d36 = Y3143 - Y314

$$Y3,14 = \frac{Y3141 + Y3142 + Y3143}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

M3	P3	Diferencia
15.9	15.9	d34 = 0.0
15.7	15.7	d35 = 0.0
15,5	15.7	d36 = - 0.2

$$= \frac{15.9 + 15.7 + 15.7}{3} = 15.767$$

3

bloque 5	M3	P3	Diferencia
	Y3,15,1	Y3,15,1	d37 = Y3151 - Y315
	Y3,15,2	Y3,15,2	d38 = Y3152 - Y315
	Y3,15,3	Y3,15,3	d39 = Y3153 - Y315

$$Y_{3,15} = \frac{Y_{3151} + Y_{3152} + Y_{3153}}{3}$$

3

Sustitución según el ejemplo contemplado:

M3	P3	Diferencia
15.2	15.5	d37 = - 0.3
15.4	15.8	d38 = - 0.4
14.9	15.3	d39 = - 0.4

$$= \frac{15.5 + 15.8 + 15.3}{3} = 15.533$$

3

c) Cálculos intermedios

c.1. Totales

$$P_1 = d_{11} + d_{12} + \dots + d_{19}$$

$$P_2 = d_{21} + d_{22} + \dots + d_{29}$$

$$M_3 = d_{31} + d_{32} + \dots + d_{39}$$

$$P_4 = d_{41} + d_{42} + \dots + d_{49}$$

$$P_5 = d_{51} + d_{52} + \dots + d_{59}$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$P_1 = (-1.2) + (-1.7) + (2.0) + \dots + (-1.6) = -14.7$$

$$P_2 = (-0.9) + (-0.5) + (-0.8) + \dots + (-1.1) = -6.3$$

$$M_3 = (-0.4) + (0.0) + (0.0) + \dots + (-0.4) = -1.7$$

$$P_4 = (0.8) + (1.0) + (0.5) + \dots + (0.9) = 7.0$$

$$P_5 = (1.7) + (1.4) + (1.4) + \dots + (0.8) = 13.2$$

c.2. Suma Total

$$d = d_{11} + d_{12} + \dots + d_{59}$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$d = (-1.2) + (-1.7) + \dots + (0.8) = -2.5$$

c.3. Suma total de cuadrados

$$d^2 = d_{11}^2 + d_{12}^2 + \dots + d_{59}^2$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$d^2 = (-1.2)^2 + (-1.7)^2 + \dots + (0.8)^2 = 55.71$$

c.4. Suma de los totales al cuadrado

$$T^2 = P_1^2 + P_2^2 + P_3^2 + P_4^2 + P_5^2$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$T^2 = (-14.7)^2 + (-6.3)^2 + (1.7)^2 + (7)^2 + (13.2)^2 = 481.91$$

c.5. Contraste lineal del patrón

$$L = -2P_1 - P_2 + P_4 + 2P_5$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$L = -2(-14.7) - (-6.3) + 7 + 2(13.2) = 69.1$$

d) Cálculos finales

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Tratamientos	5	$SCt = \frac{\sum ST^2}{9} - \frac{(\sum T)^2}{46}$	$MC = \frac{SCt}{5}$	
Preparaciones	1	$SCp = \frac{(P_1+P_2+P_3+P_4)^2}{36}$	$MCp = SCp$	
		$+ \frac{M_3^2}{9} - \frac{(\sum T)^2}{46}$		
Regresión lineal	1	$SCR = \frac{Lp^2}{90}$	$MCr = SCR$	$\frac{MCr}{MCE}$

c.5. Contraste lineal del patrón

$$L = -2P_1 - P_2 + P_4 + 2P_5$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$L = -2(-14.7) - (-6.3) + 7 + 2(13.2) = 69.1$$

d) Cálculos finales

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media de cuadrados	F
Tratamientos	5	$SCT = \frac{\sum ST^2}{9} - \frac{(\sum T)^2}{46}$	$MC = \frac{SCT}{5}$	
Preparaciones	1	$SCP = \frac{(P_1+P_2+P_3+P_4)^2}{36}$	$MCP = SCP$	
Regresión lineal	1	$SCR = \frac{Lp^2}{90}$	$MCR = SCR$	$\frac{MCR}{MCE}$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$Sct = \frac{481.91}{9} - \frac{(-2.5)^2}{46} = 53.409$$

$$MCt = 10.681$$

$$SCp = \frac{(-14.7 - 6.3 + 7 + 13.2)^2}{36} + \frac{(-1.7)^2}{9} - \frac{(-2.5)^2}{46} = 0.454$$

$$MCp = 0.454$$

$$SCr = \frac{(69.1)^2}{90} = 53.053$$

$$MCr = 53.053$$

$$F = 980.64$$

$$SCe = 55.71 - \frac{481.91}{9} = 2.164$$

$$MCE = 0.0541$$

Fuente de variación	Regla de decisión	
Regresión lineal	Si $F > 4.09$	El logaritmo de la dosis tiene efecto lineal sobre la respuesta.
	Si $F < 4.09$	El logaritmo de la dosis no tiene efecto lineal sobre la respuesta.

Ya que $F = 980.64 > 4.09$, logaritmo de la dosis tiene efecto lineal sobre el diámetro del halo de inhibición.

Cálculo de la potencia:

$$b = \frac{LP}{90 \log (d3/d2)}$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$b = \frac{69.1}{90 \log (0.1/0.08)} = 7.922$$

$$M = M3/(9b)$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$M = \frac{1.7}{9 (7.922)} = 0.023$$

La potencia relativa de la muestra es:

$$R = 10^M$$

Sustitución según el ejemplo contemplado:

$$R = 10^{-0.023} = 0.984$$

Para expresar la potencia de la muestra analizada se debe multiplicar por el valor teórico de la muestra:

$$(0.984) (889.2 \text{ mcg/mg}) = 874.97 \text{ mcg/mg}$$

CONCLUSIONES

1. Dada la constante reproducibilidad en sus resultados, Micrococcus luteus es la especie bacteriana utilizada -en la industria farmacéutica- para determinar la potencia de la ampicilina en los medicamentos y sus materias primas.
2. La ampicilina se considera un antibiótico bactericida de amplio espectro que inhibe la síntesis de pared celular a las cepas sensibles. Es recomendable, dependiendo del agente etiológico, para el tratamiento de enfermedades respiratorias, digestivas, biliares, bucales y dentales.
3. Para determinar la concentración de la ampicilina en un medicamento, se dispone de métodos químicos y microbiológicos, si bien estos últimos se consideran más confiables.
4. Mediante los métodos microbiológicos, es posible conocer la concentración de ampicilina en los medicamentos, sin separar previamente el principio activo del excipiente.

5. La mejor estimación de un antibiótico mediante técnicas microbiológicas requiere de la aplicación de métodos estadísticos, ya que el empleo de seres vivos no origina respuestas necesariamente iguales.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Deibel R.H. and Evans J.B.: Modified benzidine test for the detection of cytochrome containing respiratory system in microorganisms, J. Bacteriol., 79: 356-360, 1960.
- 2) Buchanan R.E. and Gibbons N.E.:
BERGE'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY
Williams & Williams Co., 8th. Edition
Baltimore, 1974.
- 3) Schleifer K.H., Meyer S.A. and Rupprecht M.: Relatedness among coagulase-negative staphylococci: deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies, Arch. Microbiol., 122: 93-101, 1979.
- 4) Schleifer K.H. and Kloos W.E.: A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci, J. Clin. Microbiol., 1: 337-338, 1975.
- 5) Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci
Recommendations. Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon., 15: 107-110, 1965.

6) Krieg N.R. Holt J.G.:

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY

Williams and Wilkins, 9th. Edition

Baltimore, 1984.

7) Curry J.C. and Borovian G.E.: Selectie medium for distinguishing micrococci from staphylococci in the clinical laboratory, J. Clin. Microbiol., 4: 445-457, 1976.

8) Mac Faddin F. J.

BIOCHEMICAL TEST FOR IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA

Williams & Wilkins, 1a. Reimpresion

Baltimore, 1990.

9) FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

Quinta edición

México, 1988.

10) Budavari S., O'Neil J.M., Smith A. and Heckelman E.P.:

THE MERCK INDEX

Merck & Co., Inc., 11th. Edition.

Rahway, N.J., U.S.A., 1989.

- 11) Brooks G.F. and Barriere S.L.: Clinical use of the new beta-lactam antimicrobial drugs, *Ann. Intern. Med.*, 98: 530-535, 1983.
- 12) Gordon R.C., Regamey C. and Kirby W.M.M.: Comparative clinical pharmacology of amoxicillin and ampicillin administered orally, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1: 504-507, 1972.
- 13) Richmond M.H. and Sykeys R.B.: The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role, *Adv. Microb. Physiol.*, 9: 31-88, 1973.
- 14) DICCIONARIO DE ESPECIALIDADES FARMACEUTICAS
36a. Edición
México, 1990.
- 15) Barry A.L.:
PROCEDURES FOR TESTING ANTIMICROBIAL AGENTS IN
AGAR MEDIA; THEORETICAL CONSIDERATIONS
Williams & Wilkins, 1st. Edition
Baltimore, 1980.

- 16) D'Amato R.F. and Hochstein L.: Evaluation of a rapid inoculum preparation method for agar disk diffusion susceptibility testing, *J. Clin. Microbiol.*, 15: 282-285, 1982.
- 17) Ericsson H.M. and Sherris J.C.: Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study, *Acta Pathol. Microbiol. Scand Suppl.*, 217: 1-90, 1971.
- 18) Barry A.L., Coyle M.B., Thornsberry C., Gearlach E.H. and Hawkinson R.W.: Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby susceptibility test, *J. Clin. Microbiol.*, 10: 885-889, 1979.
- 19) Ryan K.J., Needham G.M., Dunsmoor C.L. and Sherris J.C.: Stability of antibiotics and chemotherapeutic in agar plates, *Appl. Microbiol.*, 20: 447-451, 1970.
- 20) Nachtmann F. and Gstrein K.: Comparison of analytical methods for beta-lactam antibiotics, *Acta Pharm. Technol.*, 26(4): 223-226, 1980.

21) Marietta S.B. and Stanley E. Katz.: Simplified plate diffusion system for microbial assays of antibiotics, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70(4): 641-646, 1987.

22) Kavanagh F. and Ragheb H.S.: Microbiological assays for antibiotic and vitamins: considerations for assuring accuracy, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 62(4): 233-243, 1979.

23) Schapoval C.R. and Scherman E.E.: Determination of aminoglycoside antibiotic in pharmaceutical preparations, microbiological cylinder-plate assay method, Rev. Cienc. Farm., 5: 17-20, 1983.

24) Korkeala H., Osmo J., Maki P. and Hirn J.,
Nonspecific inhibition zones caused by the kidneys
of horses in different agar diffusion methods,
Arch. Lebensmittelhyg., 36(3): 68-71, 1985.

25) CODE OF FEDERAL REGULATIONS

Title 21, parts 300 to 499

Washington, 1989.