

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS
VALORACIONES DE AMPICILINA

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a

GUADALUPE ALBERTA MERCADO REYES

México, D. F.

1973



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: Q.F.B. Oscar Amor Dodero
VOCAL: Q.F.B. Bice V. Novi Avila
SECRETARIO: Q.F.B. Andrés Zúñiga Padilla
1er. SUPLENTE: Q.F.B. Ethelvina Medrano de Jaimes
2o. SUPLENTE: Q.F.B. Dea Coronado Perdomo

SITIO DONDE SE DESARROLLO
EL TEMA:

LABORATORIOS OFIMEX, S. A.

Calzada de Tlalpan 4368

México 22, D.F.

SUSTENTANTE: Guadalupe Alberta Mercado Reyes
ASESOR DEL TEMA: Q.F.B. Andrés Zúñiga Padilla

A mis queridos padres que siempre
me han ayudado y animado en todos
mis esfuerzos

A mis hermanos con profundo
cariño y respeto

A Miguel mi cariño por contribuir
a hacer más amable la tarea que
me impuse

Al Sr. Andrés Zúñiga cuyas nobles
y sabias enseñanzas convirtió en
hermosa realidad mis más caros
anhelos

Al Sr. Eduardo López por su
desinteresada ayuda y apoyo en
el desarrollo de esta tesis

A todos ellos desde el fondo de
mi corazón les tributo mi más
conmovidada gratitud

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	2
Propiedades	2
Absorción y Eliminación	3
Mecanismo de Acción	4
Degradación	8
REVISION BIBLIOGRAFICA	11
METODOLOGIA	16
Cromatográfico en Placa Fina	16
Hidroxilamina	19
Microbiológico	23
Sulfato de Cobre	48
Yodométrico	52
Acidimétrico con Perclórico	58
Hidróxido de Sodio	62
ESTUDIO ESTADISTICO	64
Microbiológico	64
Sulfato de Cobre	68
Yodométrico	71
Acidimétrico con Perclórico	72
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFIA	76

INTRODUCCION

El objetivo principal del presente trabajo es la búsqueda de un método adecuado para cuantificar la actividad farmacológica de la Ampicilina; se desarrolló en base al conocimiento clásico de la hidrólisis que sufre la Penicilina G de la cual se han reportado varios trabajos.

Es sabido que la Ampicilina al igual que la Penicilina G es susceptible de sufrir degradación de tipo hidrolítico, en consecuencia, es necesario efectuar un minucioso estudio para poder determinar cuál o cuáles de los métodos químicos existentes hasta ahora puede sustituir eficazmente al método microbiológico.

Las ventajas derivadas del uso del método químico adecuado, es la disminución de tiempo y exceso de manipulación que ocasiona el método microbiológico.

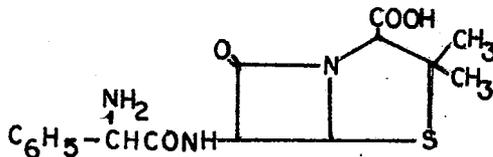
Por tal motivo se probaron simultáneamente los métodos microbiológico, yodométrico, sulfato de cobre y acidimétrico; siempre y cuando se valore el grupo responsable de la actividad farmacológica de Ampicilina.

GENERALIDADES

El Trihidrato de Ampicilina (B.P.) o el Acido 6 - D(-) -

« Aminofenilacetamido Penicilánico, cuya fórmula estructural es

$C_{16}H_{19}N_3O_4S \cdot 3H_2O$ tiene un peso molecular de 403.5



Se presenta como un polvo microcristalino blanco, inodoro y de sabor amargo, contiene del 12 al 15% de agua en peso; una solución al 0.25% tiene un pH de 3.5 a 5.5, es soluble 1 en 150 de agua, casi insoluble en alcohol, acetona, cloroformo, éter y aceites fijos.

Su obtención está patentada por Doyle et Al U.S. pat. 2,985,648 (1961); eidem Brit pat 902,703 (1962 a Laboratorios Beecham). (1)

El Trihidrato de Ampicilina es una penicilina de origen semi-sintético, ácido resistente, con acción bactericida de amplio espectro, atóxico; su molécula es desactivada por la penicilinasas.

Actúa semejante a la Bencilpenicilina contra los microorganismos Gram positivos incluyendo *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus*

penumoniae y *Streptococcus hemolítico*, aunque es menos potente que aquella tiene una acción parecida a las Tetraciclinas y al Cloranfenicol contra microorganismos Gram negativos particularmente *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Salmonellas* y *Shigellas*, la *Listeria monocitogenes* es altamente sensible. Sus concentraciones inhibitorias mínimas son del rango de 0.2 a 5 mcg. por ml. (2)

Absorción y Eliminación.- La Ampicilina es relativamente estable en secreciones gástricas y es absorbida en el tracto gastro-intestinal después de administración por vía oral. Sus concentraciones máximas en suero son obtenidas a las dos horas y se han reportado en un rango de 0.8 a 8.5 mcg. por ml. Un 20% está unido a proteínas plasmáticas en la circulación. Difunde através de la placenta, y se ha encontrado en concentraciones altas en el líquido cefaloraquídeo cuando las meninges están infectadas. Un 30% de una dosis oral es excretada en la orina en 6 a 8 hrs.

Las concentraciones urinarias van desde 0.25 a 2.5 mg. por ml. Una concentración alta es alcanzada en la bilis. Su eliminación renal es retardada cuando se usa Probenecid.

La mejor vía de administración se considera la intramuscular

por que presente un caso farmacocinético interesante debido a que el proceso de absorción es más lento que su proceso de eliminación. (3)

Dosis.- 1 a 6 gramos diarios en dosis divididas.

Nota.- 1.15 gr. de Trihidrato de Ampicilina es equivalente aproximadamente a 1 gr. de Ampicilina.

Mecanismo de Acción.- La Ampicilina actúa atacando la pared celular microbiana, la cual está formada de una estructura rígida que entre otras cosas, protege la frágil membrana citoplásmica de la alta presión osmótica del interior de la célula. Si algunas alteraciones son introducidas a la pared celular, la membrana citoplásmica puede ser lastimada, y a no ser que la célula esté en un medio ambiente de alta presión osmótica, se lisa.

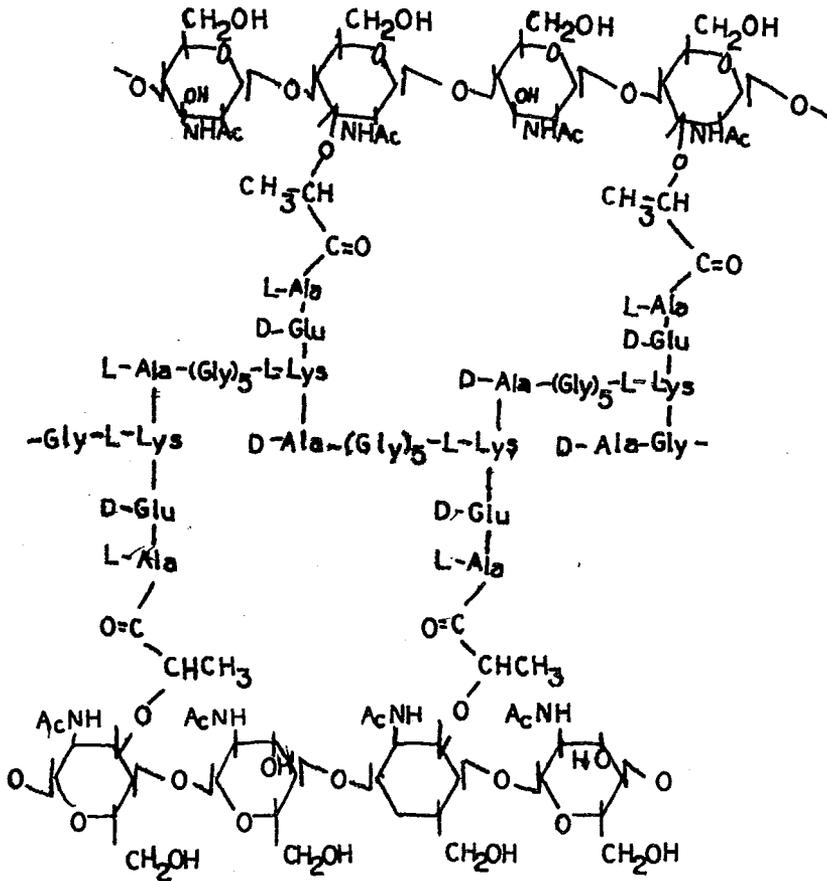
En la mayoría de los organismos Gram positivos, por ejemplo el *Staphylococcus aureus*, la pared celular está constituida por una estructura compleja hecha de una variedad de materias polímeras que incluyen la lipoproteína, lipopolisácarido, ácido teichoico y mucopéptido. El mucopéptido parece ser una molécula gigante muy enredada que da la rigidez y forma a la célula. Esta estructura se denomina "murein sacculus" (del latín murus = muro, pared). El mucopéptido está formado por D-N Acetilglucosamina alternada con unidades de

Acido N-Acetilmurámico unidos beta (1-4) en ambos casos. Unido por vía del carbonilo del ácido murámico que es el 3-D-Lactil éter de la D-Glucosamina, está una cadena polipeptídica de composición variable según la especie de bacteria. En el caso de *Estafilococcus aureus* esta cadena peptídica está formada de L-alanina, D-ácido glutámico, L-lisina y D-alanina. El ácido glutámico en los precursores de la pared celular está libre pero es convertido a la amida antes de su incorporación a la pared celular. Finalmente en *S. aureus* los hilos de murcina están atravesados por puentes que contienen 5 unidades de glicina para formar así el Sacculus mureíno. Estos puentes unen el E-amino de la L-lisina de una cadena con el carbonilo terminal D-alanina de otro. Este concepto de la pared celular fué propuesto por Wise y Park (4). Ver figura 1.

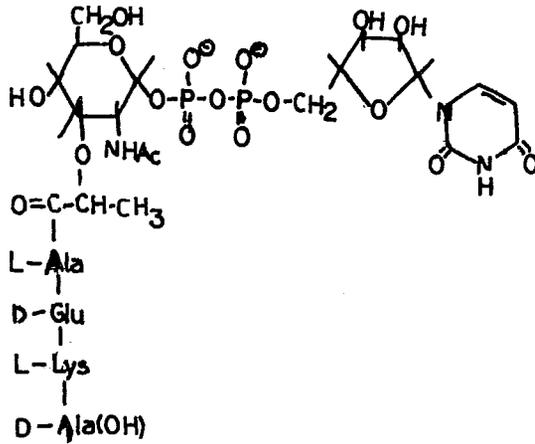
Las series de reacciones complejas que ocurren para llegar a la formación de la pared celular fueron resumidas por Park (5). Intermediarios claves en la formación de los nucleótidos de uridina que contienen el ácido murámico. De gran importancia es el hecho de que el péptido de muramilo del nucleótido descrito por Park contiene una unidad más de D-alanina que el polímero presente en la pared. Un número de investigadores ha contribuído al presente conocimiento de la secuencia metabólica que va desde la UDP-N-Acetilglucosamina al UDP-N-Acilmuramilpentapéptido (Nucleótido de Park). Se puede resumir diciendo que esta transformación consiste en 5 pasos. El

pentapéptido de muramilo es transferido al fosfolípido unido a la membrana con retención de la ligadura de alta energía del Pirofosfato. Mientras que está unido a este componente de la membrana una unidad de N-Acetilglucosamina es adicionada vía UDP-N-Acetilglucosamina para dar lugar al fosfolípido-P-P-disacárido-pentapéptido unido a la membrana. Cinco unidades de glicina son entonces adicionadas por secuencia al agrupamiento E-amino de la L-lisina en la cadena pentapeptídica. La unidad disacárida-pentapeptídica-pentaglicínica, es entonces finalmente unida transfiriéndose del transportador lípido al aceptor, supuestamente la cadena creciente del oligomuropéptido, con liberación del fosfato inorgánico y el transportador fosfolípido. Todo lo que permanece de la formación del Sacculus de mureína es la cadena lateral intercruzada de la glicina a un pentapéptido cercano, con la eliminación de la unidad terminal de la D-alanina del último.

La penicilina interfiere con la transpeptidasa intercruzada responsable de atacar el puente pentaglicínico unido a la penúltima D-alanina de la unidad pentapeptídica vecinal. La penicilina tiene una gran afinidad por el sitio activo de la enzima. Al abrirse el anillo betalactámico resulta en la formación de una ligadura covalente por acilación de la enzima, causando su inactivación. O sea en concentraciones altas compete con la porción terminal de D-alanil-D-alanina



Pared Celular "Saccus Murein" de Park. Figura 1.



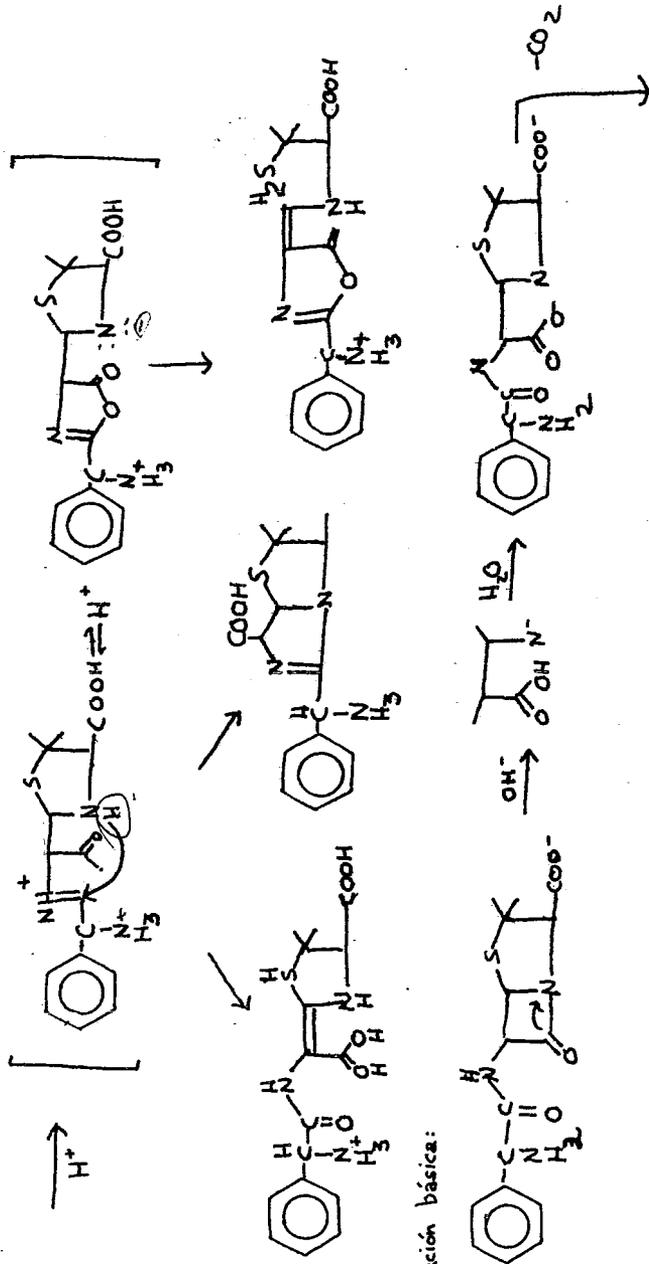
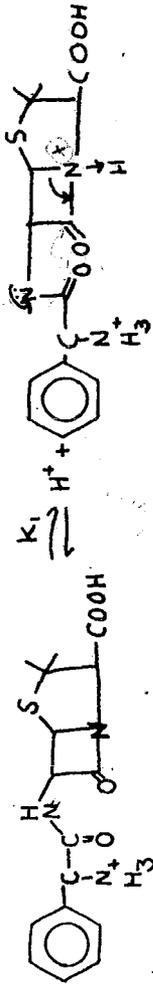
por el sitio activo de la enzima. (5)

Mecanismo de Degradación de la Ampicilina. - Basado en el conocimiento clásico de las reacciones de hidrólisis de la penicilina G (6) y la de reportes más recientes (7,8,9) los datos obtenidos en este estudio indican que el grupo amino de la cadena lateral de la ampicilina participa de forma significativa en el promedio pero no en el mecanismo de degradación. A pesar de la complejidad de las rutas de degradación la unión inicial de la estructura del anillo Blactámico parece ser el responsable de la degradación observada en solución. Las reacciones degradativas se muestran en el esquema o figura 3 (10).

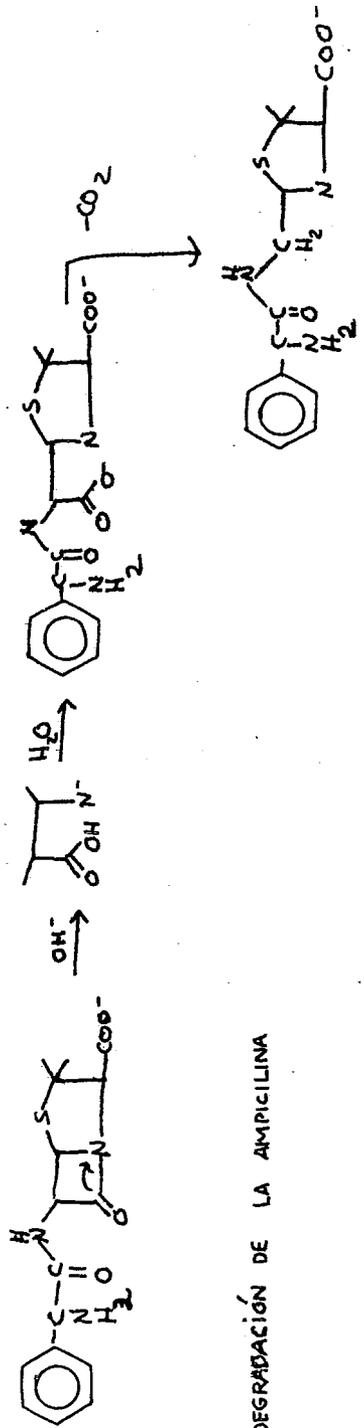
Estabilidad de la Ampicilina.- La extrema susceptibilidad de las drogas tipo penicilina a los ácidos-bases y penicilinasas es debido a que el anillo β -lactámico de cuatro miembros está elongado por unas 10 a 20 Kcal/mol, en comparación con el anillo β lactámico peptídico normal (6). Sin embargo, la relativa estabilidad ácida de esta droga es debida a la estructura química de la cadena lateral. La Ampicilina es 200 veces más estable a los ácidos que la Penicilina G (11) y parece ser que el grupo amino de la cadena lateral en la Ampicilina es el responsable de este fenómeno, el grupo amino también debe ser estereoespecífico, porque el isómero L (+) de la Ampicilina (12) es mucho menos activo que su isómera D(-) que es el usado médicamente. Se ha visto en la literatura (13) que el grupo RNH_3 forma puentes de Hidrógeno con las moléculas de agua rodeantes. Austin, et al. (14) y Grant y Alburn (15), reportan que el grupo amino cargado es el asociado con las moléculas de agua que forman los hidratos de la Ampicilina.

Es importante resaltar, que no debe asumirse que la forma hidratada de Ampicilina sea la más estable en forma sólida. Grant y Alburn (15) reportaron que en forma sólida el monohidrato es menos estable que el anhidro, especialmente a temperaturas altas y se supone que es debido a la hidrólisis inicial que la molécula de agua origina.

En solución ácida y neutra:



En solución básica:



DEGRADACIÓN DE LA AMPICILINA

REVISION BIBLIOGRAFICA

Con el descubrimiento de la Penicilina en 1929 por Sir Alexander Fleming se originaron una serie de estudios e investigaciones hasta demostrar en 1940 su utilidad potencial para controlar las infecciones (16).

En 1943 se sugiere una posible estructura de la penicilina en base a las investigaciones desarrolladas en Merck y Oxford y es hasta 1945 que con métodos cristalográficos de Rayos X se confirma un sistema de anillos β lactámico y tiazolidina. Estos grupos son responsables de la actividad de la penicilina a nivel de pared celular originando una interacción en la biosíntesis de la misma. (17)

La Ampicilina es una penicilina semisintética cuya obtención está patentada (1).

Abraham y Chain en 1942 después de una serie de observaciones llegaron a la conclusión que en presencia de alcalis se inactiva la penicilina debido a la formación de un grupo ácido, esto fué de gran utilidad para la búsqueda del método adecuado para el análisis de la penicilina. (18)

También Foster vió que cuando la penicilina es inactivada por penicilinasas se forma un grupo ácido (19).

Murtaugh y Levy aportan una titulación potenciométrica de la penicilina con enzima penicilinasas e Hidróxido de Sodio 0.02 N a pH = 6.8 como condición. (20)

John J. Scudi proporciona un método colorimétrico basado en la formación de un grupo cromóforo etilendiamínico (22), y además propone un micrométodo utilizando un compuesto de fuerte fluorescencia que es la 2-metoxi-6-cloro-(β -aminoetil)-aminoacridina. (23)

Un método singular originado por Richard J. Henry y Riley D. Housewright versa sobre la formación de CO₂ y su medición manométrica, al actuar sobre la molécula de penicilina la penicilinasas. (21)

Método Birner basado en la medición colorimétrica de derivados nitrado de la fenoximetilpenicilina y el ácido fenoxiacético en muestras de fermentación (24).

Dorothy J. Hiscox, utiliza un método a partir del análisis químico de penicilinas cristalinas usando Ferricianuro de Potasio como agente oxidante y titulando con Sulfato Cérico al 0.01 N

usando como indicador Setopalina. (25)

Edward A. Garlock Jr. y Donald C. Grove efectúan la determinación cuantitativa de Bencilpenicilinas por absorción al ultravioleta. (26)

El método de B.A. Pappas y J.D. Duerr es una evaluación por rotación óptica en Aceite de Sésamo extrayendo con Cloroformo y Formamida. (28)

A.H. Thomas y R.A. Broadbridge estudiaron una separación electroforética de penicilinas y ácidos peniciloicos con su consiguiente evaluación microbiológica de la penicilina. (27)

Un método digno de estudiarse más a fondo es el diseñado por S.C. Pan en el Instituto Squibb para Investigación Médica en New Brunswick, N. J., está basado en que el ácido peniciloico producido al tratar penicilina con alcalis reduce el ácido Arsenomolibdico directamente a temperatura ambiente (22* a 28* C) en la presencia de trazas de Cloruro Mercúrico. La absorbancia del Azul de Molibdeno producido, medido con un filtro de 660 mμ, es proporcional a la concentración de ácido peniciloico usado. Cuando el ácido peniciloico es calentado en baño de agua hirviente en una solución ácida (0.1 N) de ácido sulfúrico, 98-99% de su poder reductor es destruído en 5 minutos. La penicilina puede ser extraída hasta en un 93% por una sola extracción con metil-isobutil cetona a pH = 5.5 o menor cuando la

fase acuosa está saturada al 80% con Sulfato de Amonio. El ácido peniciloico, que permanece casi completamente (97%) en la fase acuosa a pH = 5.5 puede ser extraído también eficientemente (93%) cuando el pH de la fase acuosa es bajada a menos de 3.0. Trazas de impurezas contaminantes pueden ser determinadas por separado como blancos después de destruir el ácido peniciloico por calentamiento en una solución ácida. Basados en estos principios un método fué desarrollado donde estos dos componentes pueden ser determinados simultáneamente en muestras de fermentaciones de penicilina.

La especificidad de la reacción reductora del ácido arsenomolibdico:— Relativamente pocas sustancias reducen el ácido arsenomolibdico a temperatura ambiente. Aldehidos, compuestos sulfhidrúlicos, azúcares reductores y compuestos fenólicos (monohídricos) todos fueron incapaces de reducirlo sin calentamiento. Los compuestos que sí son capaces de reducir el ácido arsenomolibdico en frío (22-28°C) incluyendo las sales inorgánicas altamente reductoras tales como la ferrosa y estanosa, ácido ascórbico, fenoles polihídricos, tales como la hidroquinona, etc. Pero al utilizar blanco se eliminan.

Una parte importante de este método es la concentración del Sulfato de Amonio que produce el efecto de Salting-Out en la extracción.

El método propuesto consiste esencialmente en una determinación directa de penicilina y un cálculo del ácido peniciloico por diferencia. (29)

METODOLOGIA

El Trihidrato de Ampicilina utilizado para realizar los diversos experimentos fué proporcionado por Quinonas S.A. y la materia de referencia fué el Trihidrato de Ampicilina de la International Chemical Reference. Su identificación se efectuó con un análisis infrarrojo y para comprobar su pureza y posible presencia de contaminantes se efectuó el siguiente método:

Método Cromatográfico en Placa Fina:-

I Preparación de placas de Sílica Gel G o fase fija.

Colocar en un recipiente la cantidad necesaria de polvo seco de Sílica Gel "G". Adicionarle agua destilada lentamente hasta la formación de una crema espesa y añadir cloroformo hasta que la masa fluya limpiamente por las paredes del recipiente. Posteriormente se sumergen las placas de vidrio cuantas veces sea necesario para obtener una capa fina y uniforme, se dejan secar al medio ambiente.

II Solvente o fase móvil.

Solución de Metanol; Acetona 1-1 en cantidad suficiente.

III Revelador.

Para ello se utilizaron vapores de Iodo Metálico.

IV Material necesario.

Tubos capilares para aplicación de las muestras diluídas.

Tanque cromatográfico de saturación con el solvente.

Tanque cromatográfico con vapores de Iodo para revelar.

V Técnica.

a) Aplicar las diluciones de la Ampicilina Trihidrato

(25, 50 y 100 microgramos), de ácido peniciloico y de glicina, por medio de tubos capilares.

b) Colocar las placas en el tanque cromatográfico y dejar correr el solvente durante 20 minutos al cabo de los cuales se sacan las placas y se marca el lugar adonde llegó el solvente.

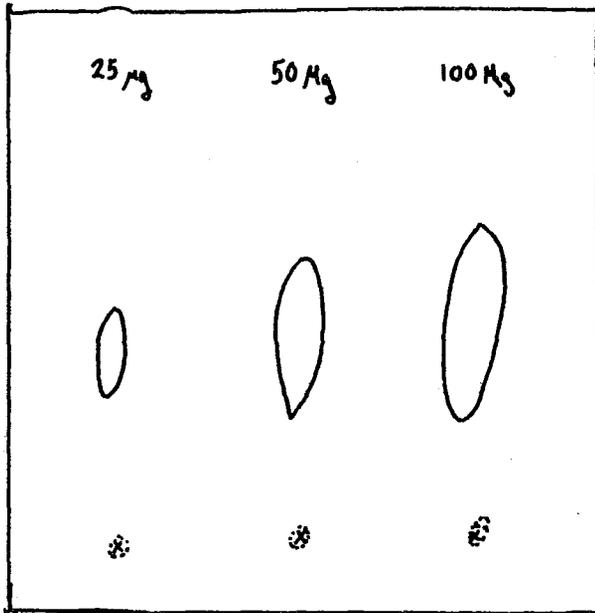
c) Después se traspasan las placas a un tanque cromatográfico de revelado con Iodo y se dejan revelar cinco minutos, después inmediatamente al sacarlas se marca el area de las manchas.

d) Sacar el Rf respectivo donde:

$$R_f = \frac{R_a \text{ distancia recorrida por muestra}}{R_x \text{ distancia recorrida por solvente}}$$

VI Resultados.

Se observó dos contaminantes que se identificaron como glicina y ácido peniciloico respectivamente. Comparando contra muestras de contenido conocido.



VII Conclusiones.

Se concluye que es necesario utilizar un método que no tenga interferencias con el ácido peniciloico ni con la glicina principales contaminantes de la Ampicilina Trihidrato.

Método Hidroxilamina

Este método se basa en el hecho de que la penicilina reacciona rápidamente con la hidroxilamina para dar ácido hidroxámico que forma un complejo púrpura con el ion férrico el cual puede ser determinado colorimétricamente.

I Soluciones:

a) Solución de Hidroxilamina 4.0 M

Se utilizan sustancias de marca Mallinkcrodt.

Clorhidrato de Hidroxilamina	70 gr
Agua destilada cbp	250 ml

b) Solución de Hidroxilamina 4.0 M con Hidróxido de Sodio 3.0 N

Se mezclan volúmenes iguales. La solución resultante (pH = 6.4) tiene una estabilidad limitada y se debe usar dentro de 24 horas.

c) Solución amortiguadora de Fosfatos pH = 7.0

Fosfato de Potasio monobásico	1.36 gr
Agua destilada cbp	200 ml

Ajustar el pH antes de aforar con una solución de Hidróxido de Sodio 0.2 M siendo aprox. 30 ml

d) Solución amortiguadora de Acetatos:

Acido Acético 0.1 N	1 volumen
Acetato de Sodio 0.1 N	4 volúmenes

e) Solución de Cloruro Férrico al 10% en Acido Clorhídrico
0.1 N

II Técnica:

a) Preparación de las muestras.

Pesar exactamente las cantidades apropiadas de Ampicilina Trihidrato, disolver y aforar con solución amortiguadora de fosfatos pH = 7.0 para lograr una concentración final de 2 millimoles.

b) Preparación del blanco:

Se efectúan las mismas diluciones que para las muestras, exceptuando la previa hidrólisis con Hidróxido de Sodio de la Ampicilina para eliminar así cualquier interferencia por contaminantes presentes en la muestra.

c) Desarrollo de color:

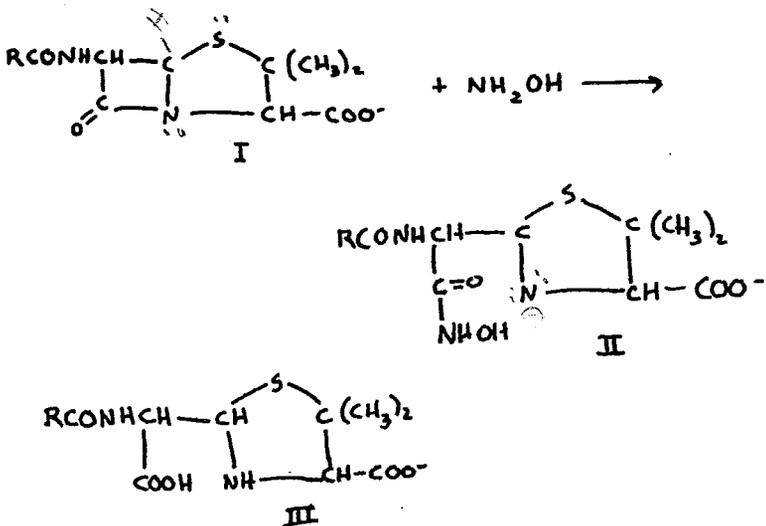
Se toman 2 ml de la solución problema agregar 2 ml de solución amortiguadora de Acetatos, haciendo lo mismo con el blanco y se agregan 2 ml de solución de hidroxilamina; dejar transcurrir exactamente 2 minutos al cabo de los cuales se les agregan 2 ml de

ácido clorhídrico y 2 ml de la solución de cloruro férrico. Deben leerse exactamente a los 15 minutos de iniciada la reacción a 540 mμ.

III Resultados:

Debido a la suma inestabilidad del color y el estricto control del tiempo no fué posible el lograr valores comparables para este método quedando incluído sólo como un método digno de efectuarse y estudiarse más a fondo.

IV Reacción:



V Conclusiones:

Esta reacción no es específica para penicilina, pues muchos estéres, anhídridos y amidas también reaccionan con hidroxilamina para producir ácidos hidroxámicos. La hidroxilamina puede reaccionar también con aldehidos o cetonas para dar oximas que forman complejos coloridos con el ion férrico. Pero se eliminan usando blanco. El inconveniente del método es su estricto control del tiempo especialmente entre la adición del cloruro férrico y la lectura en el colorímetro debido a la naturaleza inestable del color. (30)

Método Microbiológico -Cilindro Placa- F.D.A.

El fundamento de este método está basado en la potencia antimicrobiana que presenta la molécula de Ampicilina como se explicó anteriormente.

I Medios de Cultivo:

Se utilizan ingredientes que cumplan los requisitos descritos en la U.S.P. o N.F.

a) El Agar nutriente para mantener al microorganismo de prueba, debe contener las siguientes sustancias:

Peptona	6.0 g
Caseína	4.0 g
Extracto de Levadura	3.0 g
Extracto de Carne	1.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua Destilada c.b.p.	1000 ml

pH de 6.5 a 6.6 después de esterilizarse

b) La existencia en el mercado de medios de cultivo deshidratados, los cuales solamente requieren su previa hidratación y esterilización para ser utilizados, son de gran comodidad amén de

reunir todos los requisitos indispensables, como es el caso del Antibiotics Medium No. 1 de Merck & Co. usado en este método.

c) El medio para la resiembra de la cepa, preparada con 24 horas de anticipación se distribuye en tubos con medio previamente inclinados, al igual que el medio base (21 ml por caja petri de 9 cm de diámetro por 2 de alto) y el medio semilla (4 ml por caja petri) que contiene la cepa ajustada en su número de células.

II Soluciones:

a) Para efectuar las diluciones necesarias del estandar y muestra de Ampicilina trihidratada se usa una solución de Buffer de Fosfatos de Potasio de pH de 8 que contiene:

Fosfato de potasio dibásico	16.730 g
-----------------------------	----------

Fosfato de potasio monobásico	9.523 g
-------------------------------	---------

Diluídas con agua destilada y aforada la solución a 1000 ml.

b) Es necesaria una solución salina isotónica estéril para la recolección del cultivo y preparación de la suspensión a una concentración adecuada.

III Material:*

Además del común se utilizan tapas de porcelana glaseadas por fuera, micropipetas y un vernier o el Antibiotic Zone Reader

de Fisher-Lilly, así como los penicilindros de acero inoxidable.

IV Técnica:

a) Preparación del Estandar: como estandar se usa el Trihidrato de Ampicilina de la International Chemical Reference, pesado en una cantidad apropiada, disuelto y aforado a 1000 ml, de esta solución se toman las alícuotas necesarias para preparar las siguientes diluciones:

0.064, 0.080, 0.125 y 0.156 así como en mayor cantidad el punto medio de 0.100 microgramos por ml. Debidamente preparadas y en cantidad suficiente con la solución amortiguadora de fosfatos.

b) Preparación de la Muestra: pesar una cantidad apropiada de la muestra, disolverla con la solución amortiguadora de fosfatos y aforar a 1000 ml; se toma una alícuota de 1 ml y se lleva a 100 ml con la solución de fosfatos quedando una concentración final de 0.100 microgramos por ml.

c) Preparación del microorganismo de prueba: el microorganismo de prueba utilizado es la *Sarcina Lutea* (ATCC 9341) mantenido en tubos inclinados de agar. La resiembra se efectúa en tres tubos preparados con 24 horas de anticipación, incubándolos de 32* a 35*C, el crecimiento es recolectado con un poco de solución salina y perlas de vidrio, pasar la suspensión a un matraz

erlenmeyer pequeño, ajustar por dilución estandarizando dicha suspensión, de tal manera que una dilución de 1:40 tenga una transmitancia de luz de un 25% usando un fotocolorímetro adecuado con filtro de 580 milimicrones.

d) Preparación de la capa semilla: se funden 100 ml de agar, agregar 2 ml de la dilución de cepa previamente preparada teniendo cuidado de mantener la temperatura entre 40 y 45°C donde se recomienda el uso de un baño maría con temperatura constante.

*Nota: Todo debe estar perfectamente estéril excepto el medidor de inhibición para evitar cualquier contaminación y alguna posible alteración en los resultados.

e) Preparación de las placas: se colocan 21 ml del agar en cada una de las cajas petri (capa base) distribuido uniformemente, se deja solidificar, posteriormente agregar 4 ml de la capa semilla en cada caja tratando de distribuirla lo más uniforme y liso posible, dejar solidificar. Colocar los penicilindros 6 por caja de tal manera que estén a intervalos de 60° en un radio de 2.8 cm.

f) Colocación de las diluciones de la curva: para ello se requieren de 3 cajas por dilución y cada caja con 6 penicilindros, tres de ellos contienen la dilución del punto medio de corrección y

los otros 3 del punto correspondiente, de manera alternada.

Incubar las cajas de 18 a 24 hrs. a una temperatura de 32°C, ya cubierto el tiempo de incubación medir los halos con el Antibiotic Reader o con un Vernier.

g) Método de recopilación de los valores obtenidos y su interpretación: en una tabla como la que se muestra en la siguiente página se anotan los valores resultantes al medir los diámetros del halo de inhibición de cada penicilindro. Los valores obtenidos se grafican en papel semilog, la concentración en el eje de las ordenadas y el diámetro de inhibición en milímetros en el eje de las abscisas. Se efectúan las correcciones de cada uno de los puntos de la gráfica y el problema, usando para ello el punto medio correspondiente. Se aplican las fórmulas de punto alto y punto bajo especificadas anteriormente. Y se traza una línea uniendo estos dos puntos. Para interpretar los resultados obtenidos de las muestras se ve donde corresponde el diámetro del halo de inhibición obtenido y extrapolando al eje de las ordenadas se obtiene la actividad real de la muestra en microgramos.

V Efectividad del método microbiológico.

Basándonos en el hecho de que la estructura fundamental de las penicilinas comprende 3 átomos asimétricos de carbono uno de los cuales es compartido por los anillos tiazolidina y betalactámico,

Número placa	Dilu-- ción	Con- trol	Dilu ción	Con- trol	Dilu ción	Con- trol	Dilu ción	Con- trol
1								
2								
3								
Prome dio								
Correc ción								
Ajus- tado								

A

B

C

D

E

$$PA = \frac{3E + 2D + C - A}{5}$$

$$PB = \frac{3A + 2B + C - E}{5}$$

los cuales están íntimamente relacionados con la actividad microbiana de los compuestos. Cualquier tratamiento que cause ruptura del arreglo de los tres átomos de carbono asimétricos ya sea rompiendo el anillo de la tiazolidina o el betalactámico resulta en disminución de la actividad óptica pero en especial en la pérdida total de actividad antimicrobiana.]

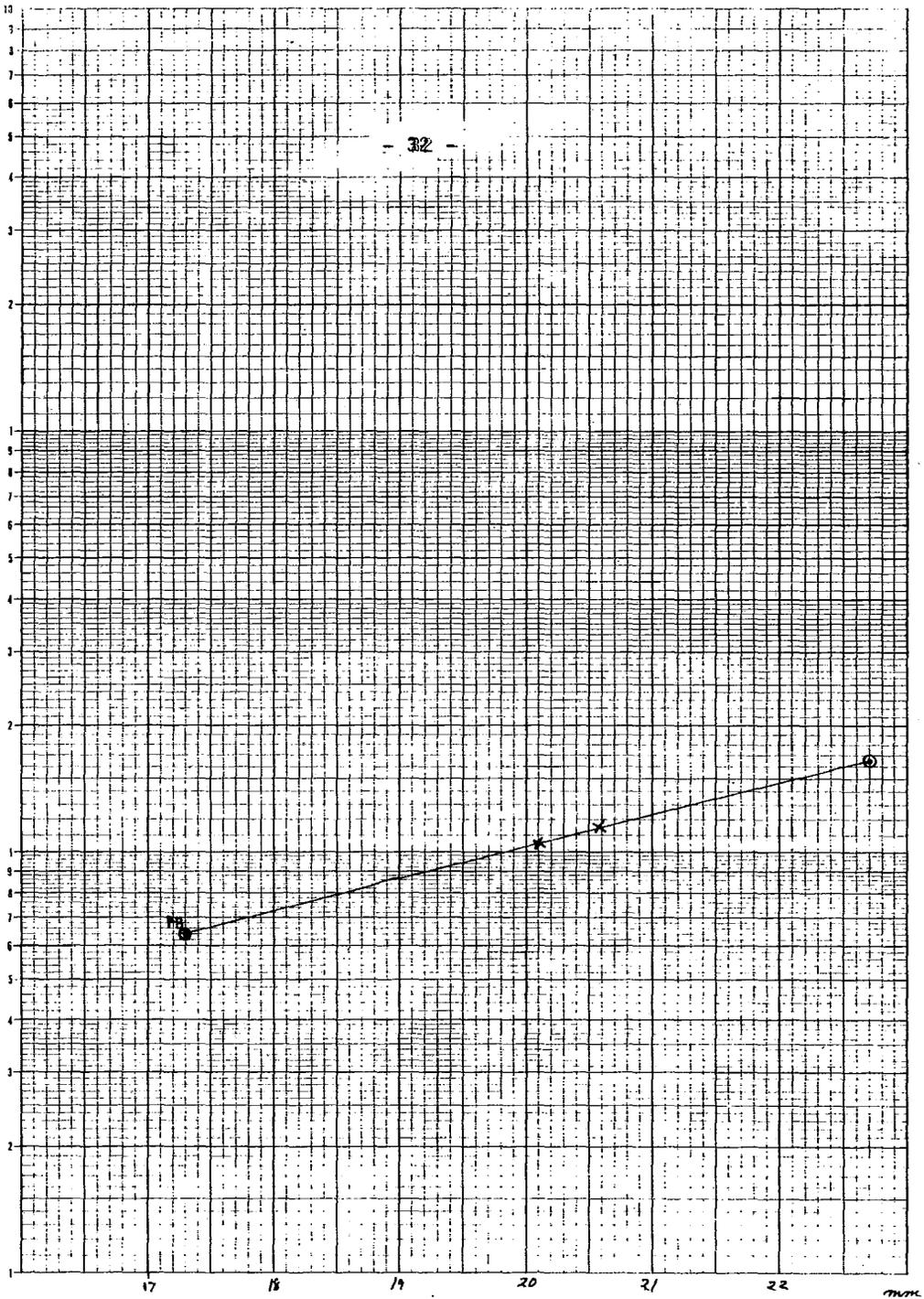
Se decidió efectuar una hidrólisis básica en una muestra previamente a su dilución, para utilizarse en el método microbiológico. Esta hidrólisis se efectuó con Hidróxido de Sodio 2 N que fué neutralizado con Acido Clorhídrico 2 N a los 15 minutos. Lográndose ver la total desaparición de su capacidad inhibitoria al desarrollo de *Sarcina Lutea*.

Número placa	0.064	0.100	0.080	0.100	0.125	0.100	0.156	0.100
1	17.0	19.6	19.6	19.8	21.1	19.1	22.3	21.0
	16.6	19.6	19.0	19.5	21.2	20.5	21.6	19.7
	16.7	20.1	18.9	20.1	21.1	20.1	22.4	20.0
2	16.8	20.3	18.5	20.3	21.5	19.8	22.8	19.5
	16.8	19.9	19.2	19.6	22.0	19.5	23.0	19.6
	16.7	19.6	19.2	20.1	21.5	20.5	22.0	19.8
3	17.1	19.5	19.5	19.5	22.2	19.5	23.0	20.6
	16.8	19.8	19.6	20.5	21.7	19.6	23.3	20.6
	16.6	19.6	19.6	20.5	21.7	20.1	22.3	19.5
Promedio	16.8	19.8	19.2	20.0	21.6	19.6	22.5	20.0
Corrección	+0.1	+0.1	-0.1	-0.1	+0.3	+0.3	-0.1	-0.1
Ajustado	16.9	19.9	19.1	19.9	21.9	19.9	22.4	19.9

$$PA = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = 22.7$$

$$PB = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = 17.3$$

Número placa	1 Q	1.100	2 Q	0.100	3Q	0.100	4 Q	0.100
1	20.6	19.5	20.4	21.4	21.1	20.0	19.5	19.8
	20.1	19.4	20.5	20.2	19.8	22.1	21.0	19.5
	18.7	19.5	19.5	20.2	21.5	20.5	20.5	20.1
2	19.3	18.6	20.8	19.6	20.5	19.6	20.4	20.3
	19.8	20.0	19.7	20.3	21.7	20.4	21.4	19.6
	19.8	21.0	20.5	19.6	19.5	20.4	20.5	20.1
3	20.0	19.1	20.0	20.5	20.2	20.3	20.2	19.5
	20.1	21.5	19.9	20.0	20.2	21.0	20.2	20.5
	20.1	19.9	20.1	20.1	20.0	19.9	21.4	20.2
Prome dio	19.8	19.8	20.2	20.2	20.5	20.5	20.6	20.0
Correc ción	+0.3		-0.1		-0.4		+0.1	
Ajus- tado	20.1	20.1	20.1	20.1	20.1	20.1	20.7	20.1



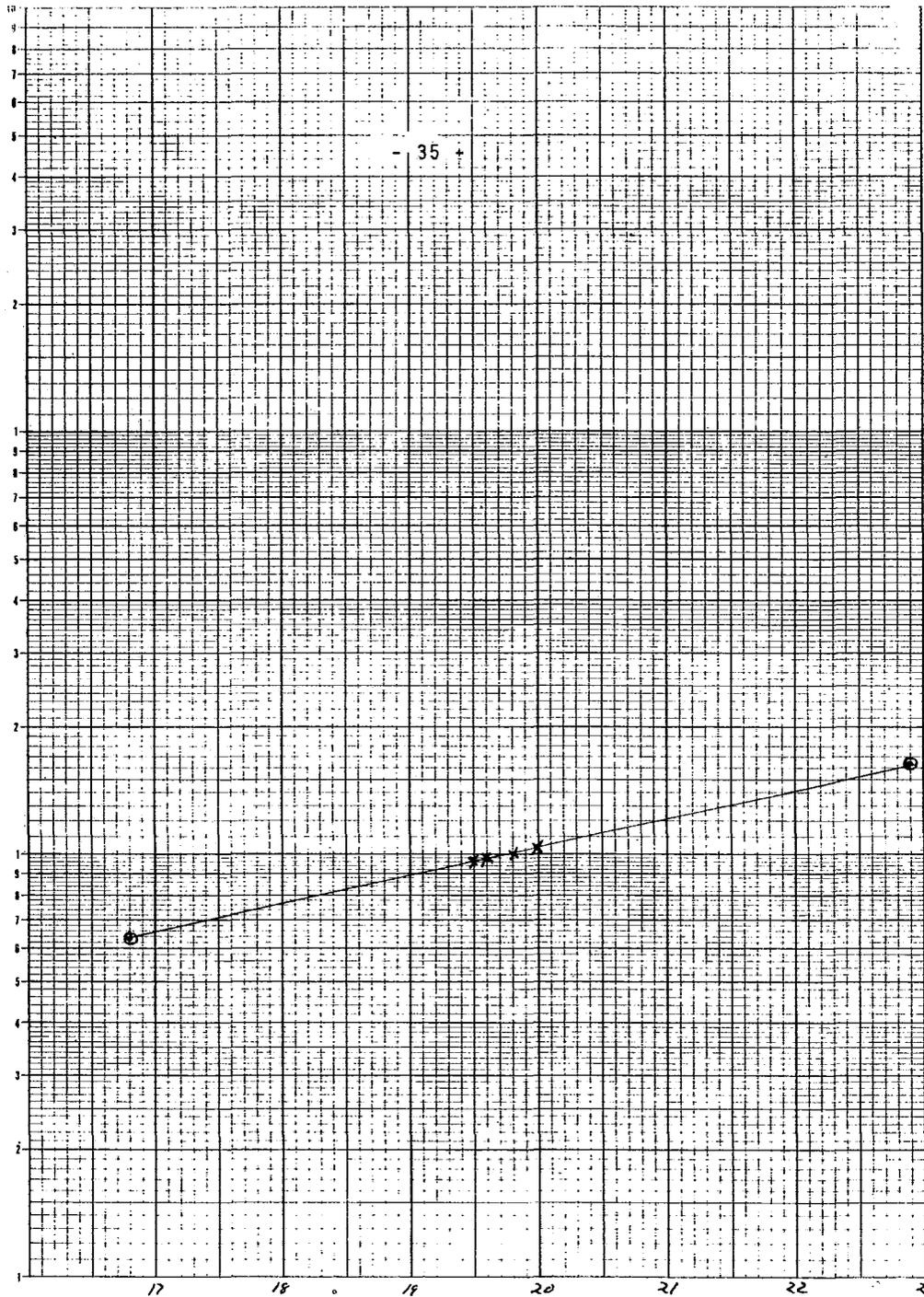
Número placa	0.064	0.100	0.080	0.100	0.125	0.100	0.156	0.100
1	16.6	19.6	19.1	19.5	22.0	19.6	23.0	19.5
	16.8	19.6	19.0	19.8	21.9	19.5	22.5	19.6
	16.7	19.7	19.2	19.6	22.1	19.6	23.0	19.6
2	16.7	19.8	19.3	19.6	22.0	19.6	22.5	19.5
	16.0	20.5	18.5	19.5	20.8	19.6	22.5	19.6
	16.8	19.5	17.9	19.6	20.7	19.7	23.0	19.6
3	16.8	19.5	18.1	19.5	20.7	19.6	22.5	19.6
	16.7	19.6	17.8	19.6	21.6	19.5	22.5	19.5
	16.1	19.6	17.9	19.8	21.5	19.6	23.0	19.6
promedio	16.6	19.7	18.5	19.6	21.5	19.6	22.7	19.7
Correc	0.0	0.0	+0.1	+0.1	+0.1	+0.1	0.0	0.0
Ajustado	16.6	19.7	18.6	19.7	21.6	19.7	22.7	19.7

$$PA = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = 22.9$$

$$PB = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = 16.8$$

Número placa	5 Q	0.100	6Q	0.100	7Q	0.100	8Q	0.100
1	19.6	19.5	20.0	19.6	20.0	19.5	18.7	19.5
	19.5	19.6	19.5	19.8	20.1	19.6	20.0	19.5
	19.5	19.6	20.0	19.5	19.6	19.7	20.0	20.0
2	19.3	19.6	19.5	19.5	19.6	19.2	18.6	19.1
	19.6	19.6	19.6	19.6	20.1	19.6	19.5	19.9
	20.0	19.6	19.5	19.6	20.1	19.6	19.5	19.5
3	19.6	19.5	20.0	19.6	20.4	19.8	19.5	19.5
	19.6	19.6	20.0	19.5	20.1	19.5	19.4	19.2
	19.9	20.0	19.9	19.6	20.0	19.6	19.5	19.5
Promedio	19.6	19.6	19.8	19.6	20.0	19.6	19.4	19.5
Corrección	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
Ajustado	19.6	19.6	19.8	19.6	20.0	19.6	19.5	19.6

- 35 -



23

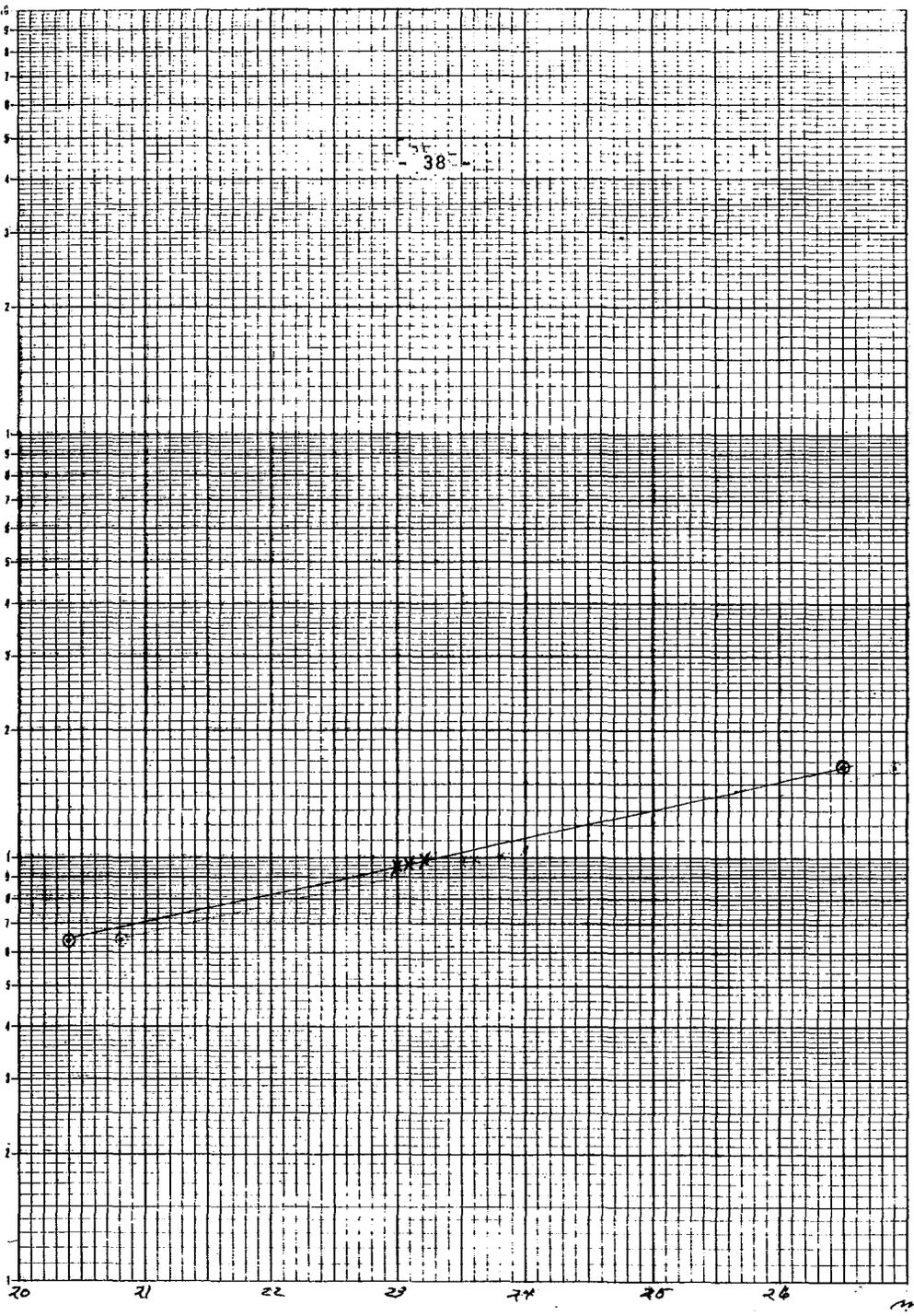
Número placa	0.064	0.100	0.080	0.100	0.125	0.100	0.156	0.100
1	19.7	23.0	23.0	23.0	25.5	22.8	26.0	24.0
	19.5	22.7	20.4	25.0	24.6	22.0	26.0	22.6
	20.0	22.0	21.3	22.0	24.5	22.0	25.8	23.6
2	20.6	23.0	22.6	23.0	23.8	22.5	25.8	23.1
	23.1	24.0	21.6	23.0	25.5	22.1	25.8	23.5
	18.4	27.0	27.5	23.0	24.3	23.1	26.0	22.4
3	20.1	22.5	21.0	23.5	22.9	23.0	27.0	22.8
	21.0	25.0	22.0	22.5	22.9	23.0	27.0	23.3
	18.1	22.5	23.5	23.0	23.0	21.6	26.9	24.6
Promedio	20.1	23.5	22.0	23.1	24.1	22.5	26.3	23.3
Corrección	0.4	0.4	0.0	0.0	0.6	0.6	0.2	0.2
Ajustado	20.5	23.1	22.0	23.1	24.7	23.1	26.5	23.1

$$PA = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = 26.3$$

$$PB = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = 20.4$$

Número placa	9 Q	0.100	10Q	0.100	11Q	0.100	12 Q	0.100
1	22.7	22.6	22.9	24.0	22.9	23.0	23.2	23.1
	22.6	22.4	23.0	22.9	23.0	24.0	23.2	24.0
	22.6	22.6	22.5	22.9	23.2	23.5	24.0	23.4
2	22.5	23.0	22.0	22.5	23.2	23.5	23.2	23.8
	22.0	23.4	23.0	23.0	23.4	24.0	24.0	23.4
	23.1	23.4	23.5	23.0	22.0	22.4	23.5	24.0
3	23.2	24.0	22.0	23.5	23.0	23.0	24.2	23.0
	22.8	24.0	23.0	23.6	22.5	23.0	22.0	23.0
	24.0	23.2	23.7	23.9	24.0	23.0	24.0	24.8
Prome dio	22.8	23.2	23.0	23.3	23.0	23.3	23.5	23.6
Correc ción	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2
Ajusta do	23.0	23.4	23.1	23.4	23.1	23.4	23.3	23.4

38



mm

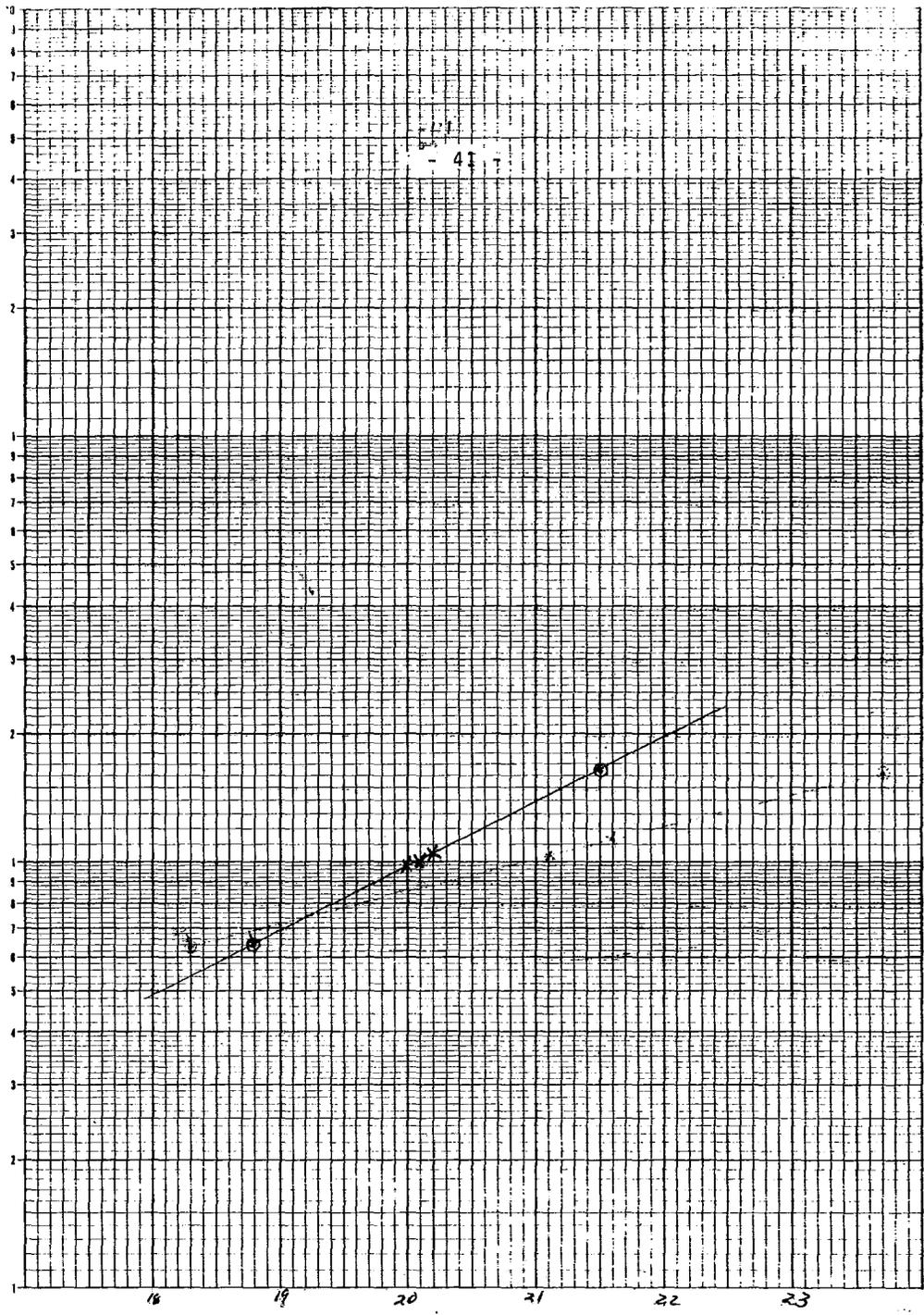
Número placa	0.064	0.100	0.080	0.100	0.125	0.100	0.156	0.100
1	20.0	21.3	19.9	19.7	19.5	19.8	21.5	19.9
	19.5	19.7	19.9	19.2	21.0	19.8	21.4	19.5
	18.3	19.7	19.5	19.7	20.6	19.9	21.5	20.0
2	19.0	20.2	19.9	20.3	21.0	19.7	21.4	20.3
	19.1	19.0	19.8	20.7	20.5	21.7	21.9	19.5
	19.5	20.2	19.5	19.2	21.7	20.0	20.2	19.5
3	18.5	20.7	19.2	20.2	20.9	20.5	23.0	20.6
	18.5	19.1	19.5	20.9	21.5	19.9	21.2	20.3
	18.3	19.7	19.7	19.8	21.2	19.9	19.8	20.3
Promedio	19.0	20.0	19.7	20.0	20.9	20.0	21.3	19.9
Corrección	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1
Ajustado	19.0	20.0	19.7	20.0	20.9	20.0	21.4	20.0

$$PA = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = 21.4$$

$$PB = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = 18.8$$

Número placa	13 Q	0.100	14Q	0.100	15Q	0.100	16Q	0.100
1	19.7	19.5	19.9	20.3	21.0	19.4	20.2	20.5
	20.2	19.4	19.5	20.0	20.0	19.9	21.3	19.8
	20.1	19.6	20.1	20.1	19.7	20.4	20.3	20.5
2	20.3	20.1	20.0	20.0	19.5	20.2	18.9	19.5
	19.9	20.6	20.2	20.3	19.2	19.9	20.3	20.1
	19.8	20.2	20.1	20.1	19.1	20.2	21.3	19.6
3	19.9	20.2	20.3	20.2	19.5	20.1	20.1	20.3
	19.7	20.4	20.6	20.2	20.0	20.0	19.0	20.1
	20.3	20.3	20.0	20.1	19.9	19.8	20.0	19.5
Prome-dio	19.9	20.0	20.1	20.1	20.1	20.0	20.1	20.1
Correc-ción	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
Ajusta-do	20.0	20.1	20.1	20.1	20.2	20.1	20.1	20.1

41



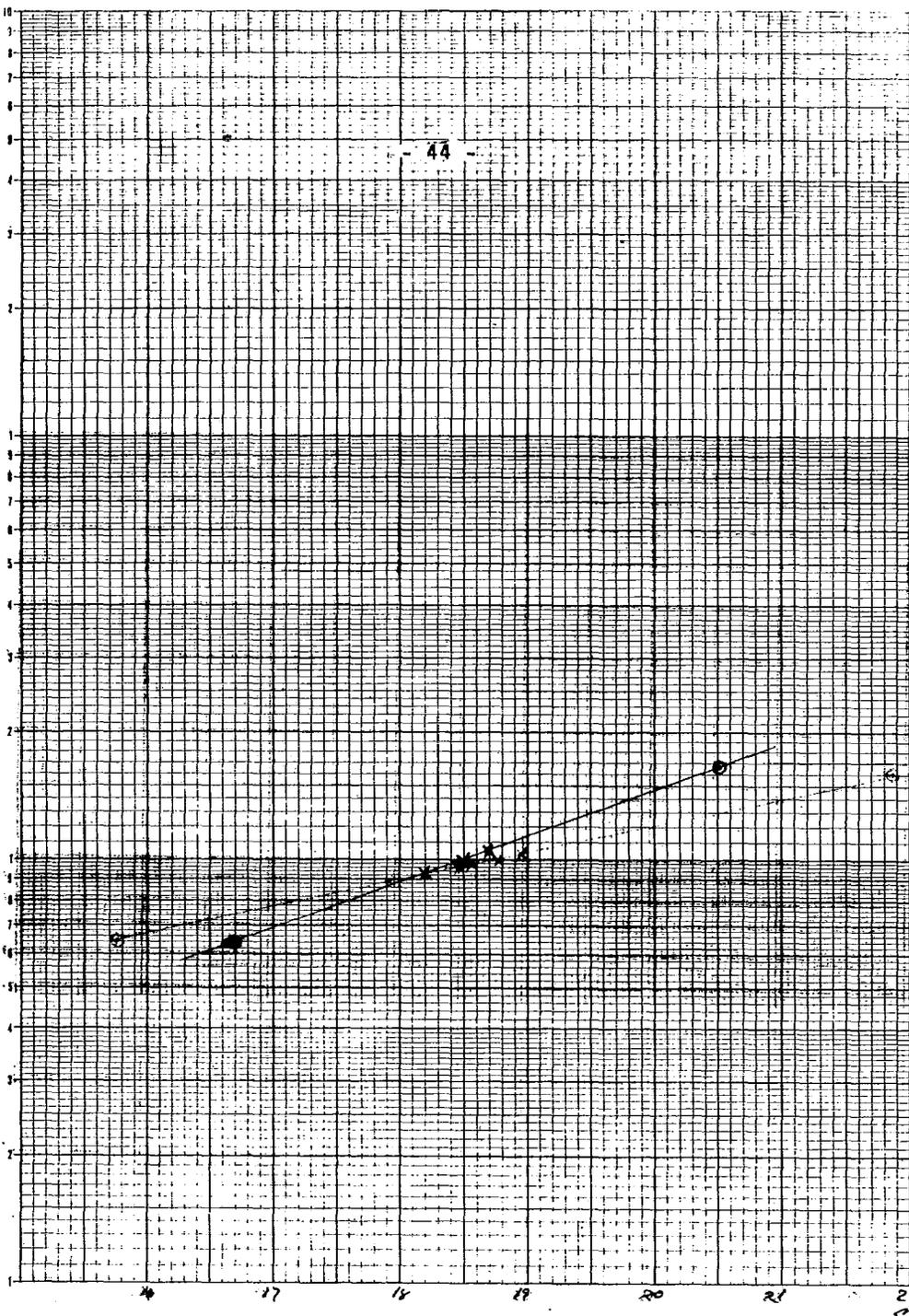
Número placa	0.064	0.100	0.080	0.100	0.125	0.100	0.156	0.100
1	17.1	18.6	17.4	19.0	19.9	18.5	20.0	18.5
	16.5	18.4	17.3	18.5	19.9	18.6	19.5	18.2
	17.0	18.7	17.1	18.4	19.5	18.5	20.0	18.0
2	16.8	18.5	17.5	18.4	19.9	18.9	20.6	18.0
	16.0	18.4	17.6	18.5	19.7	18.9	21.0	19.1
	16.3	18.1	17.4	18.5	19.8	18.5	19.5	17.8
3	17.1	18.7	18.0	18.7	19.5	18.9	20.5	18.9
	17.1	18.7	17.2	18.1	19.2	18.5	21.2	18.5
	17.2	18.6	18.0	18.5	19.5	18.0	20.1	18.5
Promedio	16.8	18.5	17.5	18.5	19.7	18.6	20.3	18.4
Corrección	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1
Ajustado	16.8	18.5	17.5	18.5	19.6	18.5	20.4	18.5

$$PA = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = 20.5$$

$$PB = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = 16.7$$

Número placa	17Q	0.100	18Q	0.100	19Q	0.100	20Q	0.100
1	17.6	18.5	19.5	18.2	20.0	18.9	18.5	18.9
	20.5	17.8	18.3	18.2	19.5	19.1	18.6	18.8
	18.7	18.5	18.3	18.5	18.3	18.9	19.0	18.5
2	18.0	18.5	18.9	18.5	19.0	19.0	18.6	18.5
	19.1	18.6	18.7	18.1	19.1	18.7	18.3	18.3
	18.6	18.8	18.3	18.2	19.5	18.6	18.5	18.5
3	19.0	18.8	18.5	18.1	18.5	18.8	19.0	18.6
	18.1	18.8	18.0	18.2	18.5	19.0	17.7	18.5
	18.7	18.5	18.0	17.9	18.3	18.9	18.5	18.5
Promedio	18.7	18.6	18.5	18.3	19.0	18.9	18.5	18.6
Corrección	0.0	0.0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.0	0.0
Ajustado	18.7	18.6	18.2	18.6	18.7	18.6	18.5	18.6

- 44 -



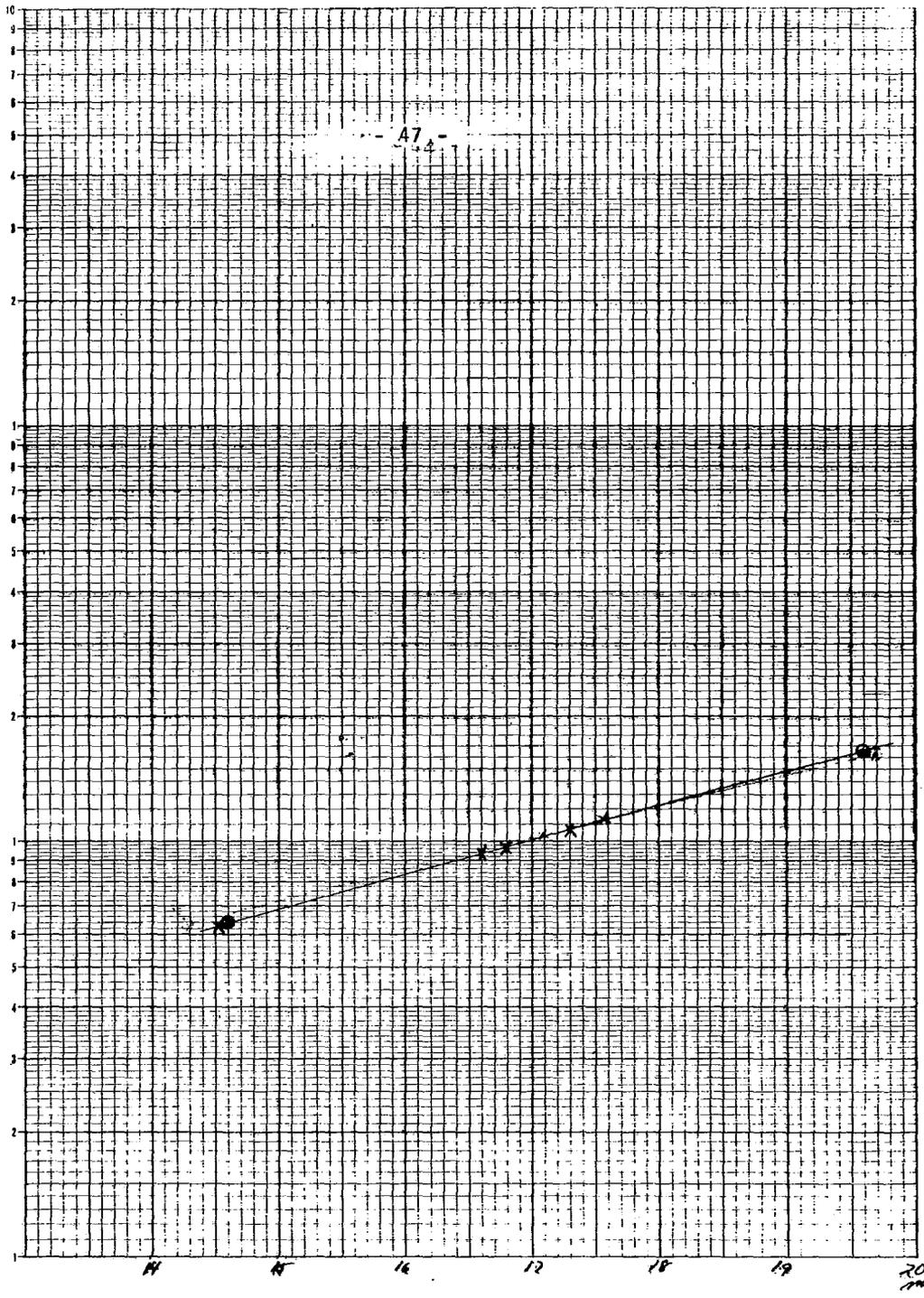
22
mm

Número placa	0.064	0.100	0.080	0.100	0.125	0.100	0.156	0.100
1	16.5	17.2	17.0	16.9	18.7	15.6	20.0	16.6
	15.5	16.4	16.0	16.1	18.7	15.3	21.5	16.8
	16.1	15.1	16.5	16.0	18.6	16.7	20.1	16.7
2	14.9	16.9	15.5	17.1	18.9	16.1	19.4	16.7
	14.0	18.0	17.1	16.9	19.6	14.1	20.3	16.0
	14.0	18.0	16.6	16.5	18.6	16.6	19.0	16.8
3	14.8	16.7	16.1	16.5	18.6	16.6	17.5	16.8
	15.0	16.9	17.1	16.5	18.7	16.9	18.9	16.7
	14.6	16.9	16.4	17.0	18.7	16.3	19.6	16.1
Promedio	14.8	16.9	16.3	16.6	18.8	16.6	19.5	16.6
Corrección	0.3	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ajustado	14.5	16.6	16.3	16.6	18.8	16.6	19.5	16.6

$$PA = \frac{3E + 2D + C - A}{5} = 19.6$$

$$PB = \frac{3A + 2B + C - E}{5} = 14.6$$

Número placa	21 Q	0.100	22 Q	0.100	23 Q	0.100	24 Q	0.100
1	17.2	17.0	15.1	17.0	15.9	16.9	15.5	16.5
	17.1	16.6	13.8	16.9	15.1	16.5	17.0	16.4
	17.0	16.7	15.5	16.9	16.0	17.0	16.5	16.4
2	16.9	16.8	14.5	17.1	17.0	17.3	16.4	15.6
	17.3	16.8	15.7	17.0	17.1	16.8	17.4	17.0
	17.8	16.7	13.5	16.8	17.3	17.2	16.5	18.0
3	17.7	17.1	14.2	16.4	17.5	16.9	16.2	16.1
	17.6	16.8	14.2	16.6	17.2	17.0	16.2	16.5
	17.4	16.6	14.0	16.7	17.0	16.7	17.4	16.9
Promedio	17.3	16.8	14.5	16.8	16.9	16.9	16.6	16.8
Corrección	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
Ajustado	17.3	16.8	14.5	16.8	16.8	16.8	16.6	16.8



20
194

Método Espectrofotométrico utilizando Buffer de Fosfatos y Solución de Sulfato de Cobre:

Este método está fundamentado en el uso de una solución amortiguadora de Sulfato de Cobre responsable de la formación de un compuesto colorido debido a la interacción del ion cobre con el anillo intacto betalactámico de la molécula de Ampicilina.

I Pesar 15.22 g de Fosfato Dibásico de Sodio (Merck) colocarlo en un matraz aforado de un litro, se agrega agua destilada suficiente hasta disolución total y adicionar una solución concentrada de ácido cítrico para ajustar el pH de 5.15 a 5.2, posteriormente añadir 15 ml de una solución de Sulfato de Cobre (Baker) al 0.4% y aforar a 1000 ml con agua destilada.*

II Se utilizó la técnica señalada por la Farmacopea Británica de 1968 y la cual refiere:

Disolver 120 mg de Ampicilina Trihidratada Estandar exactamente pesados, adicionar agua destilada suficiente para completar 100 ml, tomar una alícuota de 2 ml y llevarla a 100 ml, con una solución amortiguadora de Sulfato de Cobre; transferir 10 ml de la solución resultante a un tubo con tapa de plástico, calentar a baño maría durante 30 minutos a 75°C enfriar rápidamente a temperatura ambiente y ajustar el volumen si es necesario a

Nota: Utilizar Buffer recientemente preparado.

10 ml con agua destilada; leer la extinción en una celda de 10 ml a un máximo de 320 ^{nm} usando como blanco la misma solución amortiguadora de Sulfato de Cobre con la Ampicilina sin calentar previamente.

Calcular la cantidad de Ampicilina Trihidratada efectuando la misma operación con la muestra comparando los resultados con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorción de la muestra}}{\text{Absorción del estandar}} \times 100$$

III Desarrollando la técnica anterior para efectuar la valoración de Sulfato de Cobre se obtuvo una curva como la indicada en la gráfica 1. El espectrofotómetro utilizado fué un Spectronic 505 de Bausch & Lomb.

IV Efectividad del método de Sulfato de Cobre.

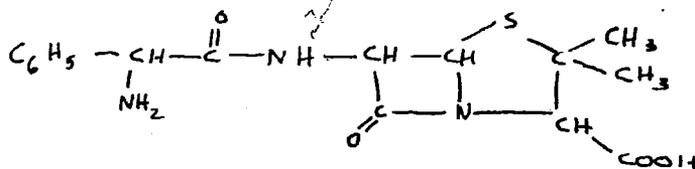
Para hacer notar la efectividad de esta técnica y su comprobación se ejecutó el siguiente experimento:

Tomar una muestra de Ampicilina Trihidratada, previamente hidrolizada en medio básico y posteriormente neutralizado para constatar si los derivados inactivos farmacológicamente, de la Ampicilina Trihidrato, forman complejos con el cobre, los cuales serían factibles de detectarse espectrofotométricamente. Ver gráfica 1 anterior.

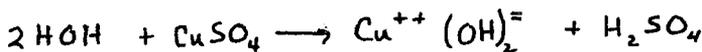
Al desarrollar lo anterior se observó que en la muestra previamente hidrolizada, no hay absorción y por consiguiente no existe la formación del complejo Cobre-Ampicilina hidrolizada. En síntesis podemos suponer la gran efectividad del método usado, debido a la formación del complejo, con el anillo intacto betalactámico de la ampicilina; al cual al efectuarse la hidrólisis por medio del calor en presencia de cobre y como sabemos que es éste el anillo responsable de la actividad antimicrobiana; concluimos la conveniencia de efectuar este método para valorar Ampicilina.

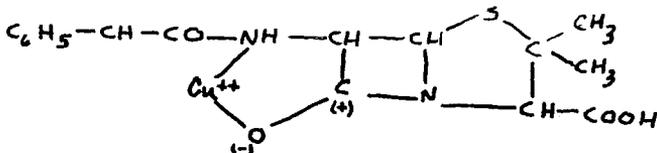
Como nota se recomienda efectuar un estandar cada vez que se realice una valoración debido a que la temperatura y el tiempo de calentamiento afectan proporcionalmente a los valores de lectura.

V Reacción química del Sulfato de Cobre con la Ampicilina intacta.



+





Método Yodométrico F.D.A.

I Soluciones: Para cubrir los requerimientos de la U.S.P. es conveniente el uso de sustancias que cumplan todos los requisitos exigidos por tal motivo en este método se utilizaron sustancias Marca Merck.

a) Solución Buffer de Fosfatos al 1% y pH = 6 contenido:

Fosfato dibásico de potasio 2 g

Fosfato de potasio monobásico 8 g

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

b) Solución de Hidróxido de Sodio 1 N. Contenido:

Hidróxido de Sodio 40 g

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

c) Solución de ácido clorhídrico 1.2 N contenido:

Acido Clorhídrico al 38.6%, se toma una alícuota de 113.3 ml y se aforan a 1000 con agua destilada.

d) Solución 0.01 N de Yodo. Contenido:

De acuerdo con la USP XVIII 100 ml de solución de Yqdo valorado 0.1 N se aforan a 1000 ml con agua destilada.

e) Solución valorada de Tiosulfato de Sodio 0.01 N contenido:

De una solución valorada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N tomar una alícuota de 100 ml y aforarla a 1000 con agua destilada.

f) Solución Indicadora de Almidón:

Un gramo pulverizado de almidón es disuelto en 10 ml de agua destilada fría, agregar 200 ml de agua caliente y poner a hervir hasta obtener una solución translúcida, se deja sedimentar y utilizar el líquido transparente.

II Técnica:

Se usó la señalada por el FDA la cual dice: Diluir una muestra pesada (30 mg aprox) de Ampicilina Trihidratada en una solución Buffer de Fosfatos al 1% de pH = 6 para tener concentración aprox. de 1.2 mg por ml.

Tomar dos matraces erlenmeyer yodométricos y adicionar a cada uno 2 ml de la solución anterior, marcarlos con el número uno y dos.

Al número uno agregar 2 ml de NaOH 1 N y dejarlo a temperatura ambiente 15 minutos, protegido de la luz, al final de este tiempo adicionar 2 ml de HCl 1.2 N y 10 ml de solución de I_2 0.01 N (volúmenes iguales de Na OH 1 N y HCl 1.2 N dan pH = 1.0) después de 15 minutos titule el exceso de yodo usando $Na_2S_2O_3$ 0.01 N, cercano al final de la titulación agregue una gota de solución de almidón; se continua titulando lentamente y se suspende cuando la coloración del complejo yodo-almidón desaparece.

Al matraz número dos que se utilizara como blanco se le agrega 10 ml de solución de yodo 0.01 N procediendo a titular inmediatamente con $Na_2S_2O_3$ 0.01 N.

III Cálculos:

a) Teóricos

$$\text{Miligramos de Ampicilina Trihidratada por ml.} = \frac{\text{Diferencia en título} \times \text{potencia del estandar en mg/ml}}{\text{Peso Muestra (mg) en 2.0 ml} \times F}$$

Donde F es igual al número de ml. de I_2 0.01 N absorbidos por 1 mg de Ampicilina Trihidrato Estándar.

b) Prácticos

$$\frac{\text{Standar}}{\text{Problema}} \times \frac{\text{mg Standar} \times \text{Eq en mg}}{\text{aforo del std.}} \times \frac{\text{aforo del problema}}{\text{mg del problema}}$$

todo por 100.

Ejemplo:

$$\frac{3.9}{3.9} \times \frac{30}{25} \times \frac{25}{30} \times 100 = 100\%$$

IV Resultados:

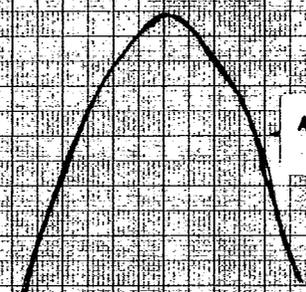
Se efectuó la misma operación con 25 muestras de la misma materia prima dando los siguientes resultados:

Muestra	Blanco	Problema	Diferencia
Std.	9.1	3.9	5.2
1	9.1	3.9	5.2
2	8.9	3.8	5.1
3	9.0	3.9	5.1
4	9.1	3.85	5.15
5	9.0	3.85	5.15
6	9.0	3.9	5.1
7	9.2	4.0	5.2
8	9.0	3.9	5.1
9	9.2	4.0	5.2
10	9.0	3.8	5.2
11	8.95	3.85	5.10
12	9.0	3.9	5.1
13	9.1	3.9	5.2
14	9.1	3.9	5.2
15	8.95	3.9	5.05

Muestra	Blanco	Problema	Diferencia
16	9.2	4.0	5.2
17	8.95	3.85	5.10
18	9.1	3.9	5.2
19	9.05	3.85	5.20
20	8.95	3.9	5.05
21	9.0	3.9	5.1
22	9.1	3.9	5.2
23	9.0	3.9	5.1
24	9.2	3.97	5.23
Peniciloico	4.4	4.45	0.0

Se comprobó así que una ampicilina degradada ya no forma complejo con el yodo de acuerdo con la última valoración efectuada.

- 57 -



Amplificadora
PREVIAMENTE

Amplificadora
Tahidatada

320 mA

Gráfico 1

Método de Titulación Acidimétrico con Ac. Perclórico -

I Solución valorada de Acido Perclórico 0.1 N

Se mezclan 8.5 ml de ácido perclórico con 500 ml de ácido acético glacial, se deja enfriar y se le añade anhídrido acético y aforar a 1000 ml con ácido acético glacial. Valorándose de la siguiente manera: Pesar exactamente 700 mg de Biftalato de potasio, previamente molido y secado a 120* durante 2 horas, se disuelve en 50 ml de ácido acético glacial en un matraz erlenmeyer de 250 ml. Agregar 2 gotas de Indicador de Violeta Cristal 'S.R. titulado con la solución de ácido perclórico hasta que el color violeta cambie a verde esmeralda. Se deduce el volumen de ácido perclórico consumido por 50 ml de ácido acético glacial, se calcula la normalidad. Cada 20.42 mg de Biftalato de Potasio es equivalente a 1 ml de ácido perclórico 0.1 N.

II Técnica:

De acuerdo con lo señalado por el FDA, referente a titulación de la amina de la Ampicilina Trihidratada y que nos dice:

Transfiera una cantidad exactamente pesada de 400-500 mg de muestra a un erlenmeyer de 250 ml., agregue 50 ml de ácido acético glacial, y mientras se agita, caliente en un baño de agua a 70*C hasta que la muestra esté completamente disuelta. Agregue 3

gotas de una solución al 0.5% de Violeta Cristal en Acido Acético Glacial como indicador. Se titula con Acido Perclórico 0.1 N en Acido Acético Glacial hasta el primer punto verde claro. Cada mililitro de ácido perclórico 0.1 N es equivalente a 34.94 mg de Ampicilina. Calcule el contenido de Ampicilina en relación a la base anhidra.

III Resultados:

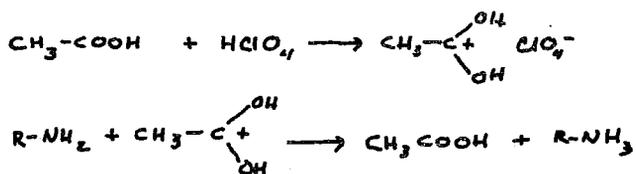
Al efectuar las valoraciones resultó imposible ver el vire correcto usando como indicador Violeta de Cristal pues dió en todos los casos el doble o más de porciento de valor del verdadero, aunque fué constante este error, se anotan a continuación los valores obtenidos, aunque no es correcto su resultado.

Muestra	ml. gastados	Muestra	ml. gastados
1	5.2	14	5.1
2	5.1	15	5.1
3	5.1	16	5.4
4	5.1	17	5.1
5	5.1	18	5.0
6	5.2	19	5.1
7	5.0	20	5.0
8	5.0	21	5.0
9	5.0	22	4.9

Muestra	ml. gastados	Muestra	ml. gastados
10	5.1	23	5.1
11	5.0	24	5.2
12	5.1	25	5.0
13	5.0		

IV Conclusiones:

Es un método además de inexacto, costoso, sumamente peligroso por las quemaduras que produce y la dificultad para lograr ver el vire del indicador debido al color azul verde claro que resulta y su alta sensibilidad a la humedad del aire. Es un método específico para medir el número de grupos amino en una sustancia y sólo sirve para cuantear su existencia, no mide la parte responsable de la actividad antimicrobiana de la ampicilina trihidratada pues reacciona igualmente con el ácido peniciloico inactivo y la glicina.



Aunque el ácido acético glacial es obviamente un solvente acídico se puede considerar también anfiprótico, a tal grado que es protonado por el ácido perclórico. Otros indicadores que se pueden utilizar son además del potenciométrico con electrodos de vidrio y de cloruro de litio, el alfaaftobenceno, azul brillante de cresol, rojo de cresol, tetrabromofenoltetraclorosulfonftaleína, tropelin 00, azul de timol, xanthidrol y azul de bromo fenol. Higuchi y Bodin (31), recomiendan el uso de Rojo de Quinaldina que vira de rojo a incoloro.

Método con Hidróxido de Sodio del B.P Addendum 1964

49

I Soluciones:

a) Hidróxido de Sodio 0.1 N

Es preparado a partir del Hidróxido de Sodio 1 Normal o puede utilizarse una solución valorada de la marca Sigma S.A.

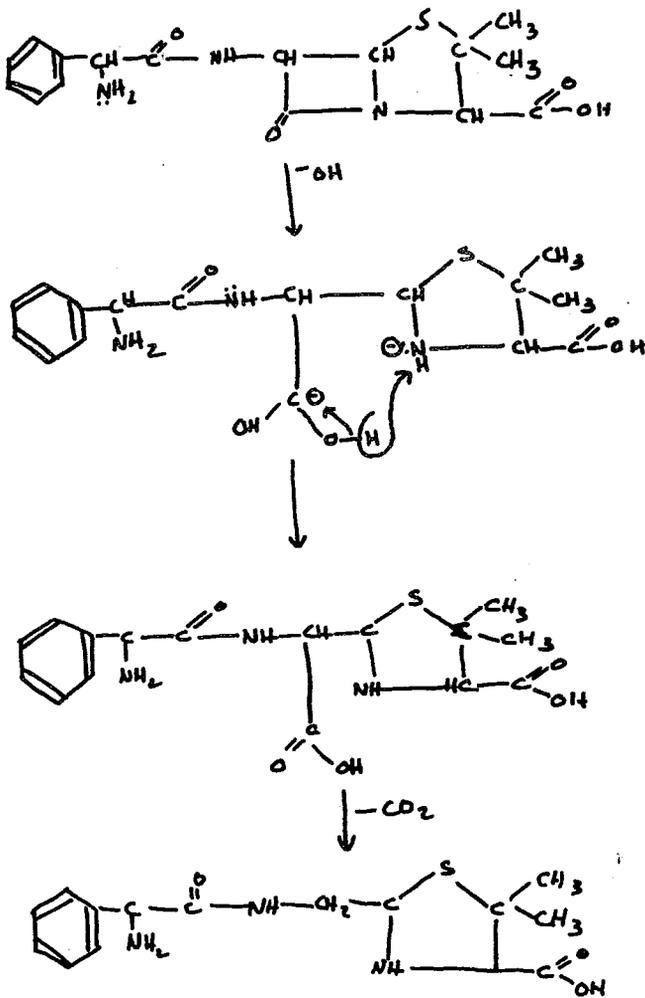
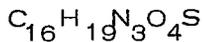
b) Solución de Acido Clorhídrico 0.1 N

Es preparada de la misma manera que la solución anterior usando en este caso Acido clorhídrico 1 N.

II Técnica:

Se disuelven aprox. 500 mg exactamente pesados de Trihidrato de Ampicilina en 100 ml de agua libre de dióxido de carbono, ajustando el pH electrométricamente a 9.60 a 25°C con Hidróxido de Sodio, se sacan los electrodos de la muestra y se enjuagan escurriendo en la muestra original con agua libre de dióxido de carbono. A la solución obtenida se calienta durante 30 minutos en B.M. después de agregarle 50 ml de NaOH 0.1 N, evitando la absorción de CO₂, enfriar a 25°C. Colocar otra vez los electrodos y se titula a pH = 9.6 con ácido clorhídrico 0.1 N manteniendo la temperatura a 25°C a través de la titulación. Se repite la operación con un blanco libre de Ampicilina Trihidratada. La diferencia entre las titulaciones representa la cantidad de Hidróxido de Sodio requerido. Cada

ml de Hidróxido de Sodio 0.1 N es equivalente a 0.03494 mg. de



ESTUDIO ESTADISTICO

I Método Microbiológico:

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
1	23.0	0.12	0.0144
2	23.1	0.02	0.0004
3	23.1	0.02	0.0004
4	23.3	0.18	0.324
Σ	92.5	0.34	0.3392
\bar{X}	23.12		$e = \frac{\tau}{\sqrt{n-1}}$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (X_n - \bar{X})^2}{n-1}} = 0.106 \quad e = 0.0588$$

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
5	20.1	0.1	0.01
6	20.1	0.1	0.01
7	20.1	0.1	0.01
8	20.7	0.5	0.25
Σ	81.0	0.8	0.28
\bar{X}	20.2		

$$\sigma = 0.3054$$

$$e = 0.1098$$

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
9	19.6	0.13	0.017
10	19.8	0.33	0.109
11	20.0	0.53	0.281
12	19.5	0.03	0.001
Σ	77.9	1.02	0.408
\bar{X}	19.47		
	$\sigma = 0.3688$	$e = 0.2129$	

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
13	20.0	0.1	0.01
14	20.1	0.0	0.00
15	20.2	0.1	0.01
16	20.1	0.0	0.00
Σ	80.4	0.2	0.02
\bar{X}	20.1		
	$\sigma = 0.08165$	$e = 0.04714$	

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
17	18.7	0.18	0.032
18	18.2	0.32	0.102
19	18.7	0.18	0.032
20	18.5	0.02	0.000
Σ	74.1	0.70	0.166
\bar{X}	18.52		
		$\sigma = 0.2352$	$e = 0.01363$

No.	N_x	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
21	17.3	1.0	1.00
22	14.5	1.8	3.24
23	16.8	0.5	0.25
24	16.6	0.3	0.09
Σ	65.2	3.6	4.58
\bar{X}	16.3		
		$\sigma = 1.235$	$e = 0.7130$

Exp	σ_n	$\sigma_n - \bar{\sigma}$	$(\sigma_n - \bar{\sigma})^2$
1	0.1060	0.1158	0.0134
2	0.3054	0.0836	0.0069
3	0.3680	0.1462	0.0213
4	0.0816	0.1402	0.0196
5	0.2352	0.0134	0.00017
6	1.2350	1.0132	1.0265
Σ	1.3312	1.5124	1.0897
$\bar{\sigma}$	0.2218		
$\bar{\sigma} = 0.4667$		$e = 0.0424$	

II Método de Sulfato de Cobre:

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
Std.	0.530	0.013	0.0002
1	0.550	0.033	0.0010
2	0.535	0.018	0.0003
3	0.520	0.007	0.0000
4	0.515	0.002	0.0000
5	0.516	0.001	0.0000
6	0.504	0.013	0.0002
Σ	3.620	0.245	0.0034
\bar{X}	0.517		
$\sigma = 0.00752$		$c = 0.00306$	

No.	X	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
7	0.610	0.020	0.0004
8	0.592	0.002	0.0000
9	0.585	0.005	0.0000
10	0.570	0.020	0.0004
11	0.570	0.020	0.0004
Ref	0.613	0.023	0.0005
Σ	3.153	0.090	0.0017
\bar{X}	0.590		
$\sigma = 0.01844$		$e = 0.00712$	

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
12	0.605	0.005	0.000025
13	0.605	0.005	0.000025
14	0.612	0.012	0.000144
15	0.620	0.020	0.00040
16	0.611	0.011	0.00012
17	0.590	0.010	0.00010
18	0.580	0.020	0.00040
19	0.577	0.023	0.00053
20	0.605	0.005	0.00025
Σ	5.405	0.111	0.001292
\bar{X}	0.600		
		$\sigma = 0.0127$	$e = 0.00453$

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
21	0.422	0.012	0.00144
22	0.454	0.020	0.0004
23	0.445	0.011	0.00012
24	0.430	0.004	0.000016
25	0.422	0.012	0.000144
Σ	2.173	0.059	0.000824
\bar{X}	0.434		
		$\sigma = 0.01435$	$e = 0.00717$

Exp.	σn	$\sigma n - \bar{\sigma}$	$(\sigma n - \bar{\sigma})^2$
1	0.00752	0.0053	0.00003
2	0.01844	0.00519	0.00002
3	0.01270	0.00055	0.00000
4	0.01435	0.00110	0.00000
Σ	0.05301	0.01257	0.00005
$\bar{\sigma} = 0.004074$			
$\bar{\sigma} = 0.004074$		$e = 0.00238$	

III Método Yodométrico

No.	X_n	$X_n - \bar{X}$	$(X_n - \bar{X})^2$
1	5.20	0.05	0.0025
2	5.20	0.05	0.0025
3	5.10	0.05	0.0025
4	5.10	0.05	0.0025
5	5.35	0.20	0.040
6	5.25	0.10	0.010
7	5.10	0.05	0.0025
8	5.20	0.05	0.0025
9	5.20	0.05	0.0025
10	5.10	0.05	0.0025
11	5.20	0.05	0.0025
12	5.05	0.10	0.0100
13	5.10	0.05	0.0025
14	5.20	0.05	0.0025
15	5.20	0.05	0.0025
16	5.00	0.15	0.0225
17	5.20	0.05	0.0025
18	5.10	0.05	0.0025
19	5.20	0.05	0.0025
20	5.20	0.05	0.0025
21	5.05	0.10	0.0100
22	5.05	0.10	0.0100
23	5.20	0.05	0.0025
24	5.10	0.05	0.0025
25	5.23	0.08	0.0064
Σ	128.88	1.73	0.1540
\bar{X}	5.15		

$\sigma = 0.00616$

$e = 0.00123$

IV Método Acidimétrico

No.	Xn	Xn - \bar{X}	(Xn - \bar{X}) ²
1	5.2	0.12	0.0144
2	5.1	0.02	0.0004
3	5.1	0.02	0.0004
4	5.1	0.02	0.0004
5	5.1	0.02	0.0004
6	5.2	0.12	0.0144
7	5.0	0.08	0.0064
8	5.0	0.08	0.0064
9	5.0	0.08	0.0064
10	5.1	0.02	0.0004
11	5.0	0.08	0.0064
12	5.1	0.02	0.0004
13	5.0	0.08	0.0064
14	5.1	0.02	0.0004
15	5.1	0.02	0.0004
16	5.4	0.32	0.1024
17	5.1	0.02	0.0004
18	5.0	0.08	0.0064
19	5.1	0.02	0.0004
20	5.0	0.08	0.0064
21	5.0	0.08	0.0064
22	4.9	0.18	0.0324
23	5.1	0.02	0.0004
24	5.2	0.02	0.0144
25	5.0	0.08	0.0064
Σ	127.0	1.82	0.2400
\bar{X}	5.08		

$$e = \frac{e}{\sqrt{n}}$$

$$\frac{\Sigma (Xn - \bar{X})^2}{n} = 0.09798 \quad e = 0.0196$$

CONCLUSIONES

I Cromatografía en Placa Fina:

Este método es muy adecuado para determinar la pureza de la Ampicilina y al mismo tiempo sus impurezas, ya sea de síntesis o degradación, el problema en este método se presenta en la elución de ésta en el soporte; si no se tiene experiencia, los recobros no son constantes.

II Método Microbiológico:

Es indudable que el mejor método de valorar los antibióticos en forma general es el método microbiológico, ya que realmente se pone de manifiesto la actividad de éste frente a un microorganismo vivo. Las limitaciones son: exceso de material, manipulaciones, mantenimiento de la cepa, contar con un departamento de microbiología, personal experimentado en este tipo de operaciones y finalmente la interpretación de los resultados.

III Método de Hidroxilamina:

Este en principio sería un método adecuado para la cuantificación de la Ampicilina, pero presenta varias limitaciones, ya que la preparación al momento de los reactivos, así como el efectuar el

desarrollo de color y la lectura en un tiempo determinado ocasiona el no obtener en forma continúa y constante las lecturas.

IV Método del Acido Perclórico:

Este, igual que el anterior, es un método muy inexacto, ya que siendo un método que se debe hacer en medio anhidro con la presencia de agua se pueden afectar grandemente los resultados, al mismo tiempo que el vire del indicador es un punto que no es posible.

V Método de Hidróxido de Sodio:

De los métodos estudiados, es uno de los más inexactos, esto es debido a los muchos factores; los que se tienen que controlar, siendo uno de ellos el CO_2 ambiental y como la valoración es de los grupos carboxilos, es fácil que se puedan cometer errores.

VI Método Yodométrico:

Es, dentro de todos, el que se encuentra más difundido en cuanto a su uso, y casi se puede afirmar que cualquier laboratorio tiene este método montado.

Las limitaciones que se pueden anotar al respecto son: habilidad del personal para ver el vire, tiempo y condiciones de la

reacción del yodo con la Ampicilina, preparación del blanco, ya que de ello depende que se detecte la Ampicilina farmacológicamente activa, y los posibles excipientes presentes.

VII Método del Sulfato de Cobre;

Después de la serie de estudios realizados, se concluye que es el más adecuado para la valoración de la Ampicilina, con las variantes de: aumentar el tiempo de reacción a 60 minutos y depender del material adecuado para alcanzar la temperatura deseada para poder efectuar la lectura, sin embargo, se observó que se obtienen los resultados en cuanto a densidad óptica constante, dando una idea de la reproductividad del método. Además es una reacción específica para la Ampicilina, ya que en ella interviene el anillo beta-lactámico responsable de la acción farmacológica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Index Merck, Ed. Merck 18a. edición p. 75
- 2.- Martindale, Extra Pharmacopoeia, 25 ed. (1966).
- 3.- J.T. Doluisio, J.C. Lapiana y L.W. Dittert J. Pharma. Sci. 60, 715 (1971)
- 4.- E.M. Wise Jr., J.T. Park
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 75 (1965)
- 5.- J.T. Park en Biochemical Studies of Antimicrobial Drugs, B.A. Newton y P.E. Reynolds, eds., Cambridge University Press, London, (1966) p. 70
- 6.- Clarke, H.T., Johnson, J.R., and Robinson, R., eds., "The Chemistry of Penicillin", Princeton, N.J., 1949, pp. 415-454.
- 7.- Rapson, H.D.C., and Bird, A.E., J. Pharmacol., 15, 222 T, 1963.
- 8.- Levin, B.B., Arch. Biochem. Biophys., 93, 50 (1961).
- 9.- Schwartz, M.A., J. Pharm. Sci., 54, 472 (1965)
- 10.- Journal of Pharmaceutical Sciences 48, No. 4 (1969) pp. 447-454.
- 11.- Doyle, F.P., Nayler, J.H.C., Smith, H., and Stove, E.R., Nature 191, 1091 (1961).
- 12.- Doyle, F.P. Nayler, J.H.C., and Smith, H., U.S. Patent, No. 2985648, May (1961).

- 13.- Bell, and Bayles, J. Chem. Soc., 1518, (1952).
- 14.- Austin, K.W.B., Marshall, A.C., y Smith, H., Nature, 208, 999 (1965).
- 15.- Grant, N.H., and Alburn, H.E., Nature, 207, 645 (1965).
- 16.- E.P. Abraham, E. Chain, C.M. Fletcher, A.D. Gardner, N.G. Haeatley, M.A. Jennings and H.W. Florey, Lancet, 2, 177 (1941).
- 17.- H.W. Florey y colaboradores, Antibiotics Vol. II. Oxford University Press, London, (1949).
- 18.- Abraham and Chain, Brit. J. Exp. Path., 23, 103 (1942).
- 19.- Foster, Science 101, 205 (1945).
- 20.- Murtaugh and Levy 67, 1042 (1945) Anal. Chem.
- 21.- Richard J. Henry y Riley D. Housewright, J. Biol. Chem. (1946) pp. 559-571.
- 22.- John J. Scudi March 22, (1946).
- 23.- Scudi and Jelenek, J. Biol. Chem. (1946) pp. 195-201.
- 24.- J. Birner, Anal. Chem. 31 No. 2 (1959) pp. 271-273.
- 25.- Dorothy J. Hiscox, Anal. Chem. 21 (1949) pp. 658-659.
- 26.- Edward A. Garlock, Grove D.C. Journal of Am. Pharm. Assoc. Feb (1950) pp. 398-400.
- 27.- A.H. Thomas et coll. Analyst (1970), 95, '1130 pp. 459-463.

- 28.- Pappas, B.A., Duerr, J.D., J. Am. Pharm. Assoc.,
47, 3 (1958) pp. 215-217.
- 29.- Pan S.C., Anal. Chem. 26 No. 9 (1945) pp. 1438-1444.
- 30.- Jared H. Ford, J. Pharm. Sci. (1947) pp. 1004-1005.
- 31.- Takeru Higuchi y Einar Broockmann-Hannsen Pharmaceutical
Analysis, Interscience Pub. U.S.A. 1961 pp. 391-394.