

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA ABSORCION DE SULFOLAX EN FORMA
DE SOLUCION ADMINISTRADO A CONEJOS

446

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ALBERTA TOXQUI TULA

MEXICO, 1976



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

CLAS. Tesis
AÑO. 1976
FECHA
CROC. 5
~~408~~ 419



PRESIDENTE; FROG. RAMON ULACIA ESTEVE
JURADO ASIGNADO VOCAL; PROF. ETHELVINA MEDRANO DE JAIMES
ORIGINALMENTE SECRETARIO; PROF. JOSE LUIS IBARMEA AVILA
1er. SUPLENTE; PROF. HECTOR JARA FARJEAT
2o. SUPLENTE; PROF. ANDRES ZUNIGA PADILLA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA;

PRODUCTOS FARMACEUTICOS, S. A. "CHINOIN".

SUSTENTANTE;


ALBERTA TOXQUI TULA

ASESOR DEL TEMA;


Q.F.B. JOSE LUIS IBARMEA AVILA

SUPERVISOR TECNICO;


Dr. HECTOR PONCE DE LEON

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

AL PROFESOR JOSE LUIS IBARMEA AVILA

Agradeciendo su valiosa asesoría en el presente trabajo.

AL PROFESOR HECTOR HARA FARJAT

AL Dr. HECTOR PONCE DE LEON

Por su colaboración.

AGRADEZCO A LOS LABORATORIOS PRODUCTOS FARMACEUTICOS, S. A. "CHINCIN"
LAS FACILIDADES BRINDADAS PARA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

I N D I C E

- I.- Introducción.
- II.- Generalidades.
- III.- Parte experimental.
- IV.- Conclusión.
- V.- Bibliografía.

I.- INTRODUCCION

Con el nombre de Sulfolax se designa a uno de los catárticos de origen sintético, del cual trata el presente trabajo enfocado principalmente a la absorción y eliminación después de haber sido administrado a conejos

Los catárticos son medicamentos que promueven la defecación, ya que debido a la irritación que producen en el tracto gastrointestinal aumentan la actividad motora y la peristalsis del intestino grueso, lo que acelera la propulsión del contenido intestinal.

Existe un gran número de compuestos fenólicos tanto de origen natural como sintético que son de gran importancia dentro del campo de los laxantes y se han usado ampliamente con este fin. Según algunos autores la acción catártica está estrechamente relacionada con la naturaleza de los productos fenólicos, por esto tales compuestos son muy efectivos, pero poseen serias desventajas ya que provocan irritación y por lo tanto aumentan la intolerancia gastrointestinal. Para superar esta inconveniencia se pensó en bloquear los grupos hidroxilo causantes de dichos efectos indeseables, para esto se recurrió a formar ésteres con ácidos orgánicos, comparando los cambios en la potencia con los compuestos fenólicos originales, se observó que algunos de estos ésteres resultantes presentaban una potencia mayor que dichos compuestos fenólicos y otros retenían la misma actividad catártica, pero en el organismo estos derivados sufrían una hidrólisis total, lo que hacía reaparecer la acción irritante. Esto llevó a pensar en la formación de ésteres estables, lo que se consiguió tratando a la sustancia fenólica con ácido sulfúrico, obteniéndose ésteres resistentes a la hidrólisis, entre ellos el Sulfolax del cual se ocupa el presente trabajo y demostró tener una acción laxante igual al compuesto fenólico original y al compararlo con otros ésteres del sulfúrico este resultó ser el más potente. Además las pruebas clínicas preliminares mues

tran que no tiene ninguna actividad antifúngica ni antibacteriana, por lo tanto no ejerce acción dañina a la flora intestinal.

Mi propósito al hacer este trabajo fue obtener datos que permitieran confirmar la eliminación total o parcial del Sulfolax administrado, así como la absorción del mismo y las posibles manifestaciones patológicas que pudiera ocasionar dicho fármaco.

Para corroborar lo antes mencionado, llevé a cabo pruebas en conejos administrando la dosis usual en el ser humano, para producir una acción laxante. Los resultados de esta acción los comparé con un grupo control de conejos, y el Sulfolax eliminado lo determiné por métodos analíticos efectuados en excremento y orina. También utilicé un método cualitativo para confirmar la absorción determinando Sulfolax en suero, así como un método para confirmar la presencia de su metabolito.

II.- GENERALIDADES

Con frecuencia se necesita corregir la adinamia intestinal que puede ser originada por diversas causas, que dan como resultado una constipación

El grupo de fármacos catárticos ha sido usado en el tratamiento de dicho síntoma, el cual se debe a una disminución funcional en la capacidad del colon para producir excrementos normalmente formados a intervalos regulares.

Los catárticos se han clasificado de acuerdo con el mecanismo por el cual ejercen su acción, y existen cuatro mecanismos fundamentales:

Catárticos irritantes.- Estos fármacos producen una acción irritante en el canal intestinal, para que el contenido sea movido rápidamente a lo largo del intestino, como resultado de un aumento en la actividad motora.

Catárticos de volumen.- Por la naturaleza de estas sustancias catárticas se produce un incremento en el contenido intestinal, lo cual conduce a un avance más rápido a través del tracto gastrointestinal. Estos catárticos son coloides hidrofílicos, fibras que resisten la digestión o sales inorgánicas que son lentamente absorbidas y retienen agua en el intestino en virtud de su presión osmótica.

Catárticos de lubricación.- El grupo de fármacos emolientes es usado para lubricar el intestino y facilitar el paso del contenido fecal. Estos fármacos tienden a cubrir los alimentos y partículas líquidas y entonces retardan la absorción y desecación.

Catárticos que disminuyen la tensión superficial.- Se usan agentes mojantes en el tratamiento de constipación para reducir la desecación de los excrementos.

Dentro del grupo de catárticos irritantes, se han usado sustancias difenólicas cuya acción catártica se debe a los grupos fenólicos, además en terapia ya es común el uso de laxantes difenólicos en forma de ésteres de

ácidos orgánicos. Tales laxantes son derivados del 4,4'-dihidroxidifenil-(2 piridil) metano. Estos derivados son menos irritantes a la mucosa del tracto gastrointestinal, pero sufren una total hidrólisis en el organismo, liberando los grupos fenólicos causantes de la irritación. Recientemente se ha sabido que se pueden obtener derivados estables y altamente activos, por esterificación de los grupos hidroxilo con ácidos inorgánicos. Uno de estos compuestos es la sal sódica del ácido 4,4'-(2picoliliden)bis fenil sulfúrico.

CAUSAS QUE ORIGINAN LA CONSTIPACION

Las causas que dan origen a la constipación pueden ser orgánicas o funcionales. Las orgánicas son por ejemplo: hipertiroidismo, lesiones de obstrucción benigna o maligna, constricción o estrechez. Sin embargo hay personas que sufren constipación sin tener lesiones orgánicas, por lo cual se sabe que existe un gran número de factores que pueden dar lugar al desarrollo de dicho síntoma, así la falta de hábitos son la principal causa de constipación, ya que el acto de defecación es fácilmente inhibido por la respuesta negativa a la sensación ocasionada por el recto lleno.

En las comidas hay tendencia a ingerir alimentos concentrados que poseen poco volumen, y es claro que la dieta que tiene poco residuo o contiene poco fluido puede conducir a constipación.

Los factores psíquicos pueden conducir a constipación.

Estados hipertónicos de la musculatura del colon producen la llamada constipación espástica, que puede ser producida por muchas causas incluyen el constante uso de catárticos irritantes.

La debilidad o actividad depresiva de la musculatura del colon puede conducir a lo que se llama constipación atónica.

MOVIMIENTOS NORMALES DEL INTESTINO

El intestino delgado presenta dos tipos de movimientos, los de mezcla o no propulsivos y los de propulsión.

Los movimientos de mezcla son de dos tipos: movimientos pendulares -- que son contracciones rítmicas de la capa longitudinal del músculo, de a _ largamiento y acortamiento, que comunican al intestino un movimiento de -- vaivén, y movimientos de segmentación rítmica de la capa circular, con di_ vici3n alternada del intestino en segmentos.

Movimientos de propulsión. Peristaltismo.- Los movimientos peristálti_ cos provocan el desplazamiento del contenido intestinal, en forma de una - onda de contracción que se produce a lo largo del intestino y que empuja - su contenido desde el duodeno al ileon.

Mecanismo de los movimientos del intestino.

Los movimientos de segmentación y pendulares son de naturaleza mióge_ na, son inherentes al músculo del intestino y se producen aun cuando el -- mismo esta desnervado. En cambio el peristaltismo depende de un reflejo - mientérico en el que interviene el plexo de Auerbach, en respuesta a esti_ mulos mecánicos y químicos del contenido intestinal, que actúan sobre re _ ceptores del plexo de Meissner.

Las terminaciones preganglionares del vago hacen contacto con el . - plexo de Auerbach y su función es aumentar el tono y el peristaltismo in _ testinales. Mientras que la función del simpático es inhibir el tono y - el peristaltismo.

Los movimientos en el colon son más complejos que aquellos en el in _ testino delgado y esta diferencia puede ser debida en parte al grado de de_ secación del contenido del colon, en el ciego y colon ascendente el conte_ nido es fluido y las ondas peristálticas y antiperistálticas ocurren fre _ cuentemente manteniendo el contenido mezclado.

Sin embargo la actividad de las porciones transversa descendente y pélvica del colon es muy irregular de aquí que el contenido sea semisólido. Al rededor de tres o cuatro veces al día una fuerte onda peristáltica causa el movimiento del contenido de una tercera parte de la longitud del colon. Esos períodos de actividad parecen relacionados a la entrada de alimentos en el estómago. El colon pélvico sirve de almacén de materia fecal hasta que ocurre la defecación. (8).

FARMACOLOGIA DEL SULFOLAX

El Sulfolax (Sal sódica del ácido 4,4'-(2 picoliliden) bis fenil sulfúrico), es un laxante cuya acción farmacológica se lleva a cabo por estimulación de las paredes intestinales, originando un aumento en la motilidad intestinal, por lo cual se clasifica entre los laxantes de contacto. Normalmente ejerce su acción a las 6 horas después de ser administrado, pero este período varía de acuerdo a la idiosincracia de cada individuo.

Debido a que el Sulfolax actúa a nivel del intestino grueso, no afecta en lo absoluto a la absorción de sustancias que normalmente se absorben en el intestino delgado. Este fármaco no se absorbe puesto que no se ha encontrado en sangre y se elimina por heces sin sufrir ninguna alteración, además de no absorberse ha demostrado ser no tóxico cuando se administra por tiempo prolongado.

La dosis terapéutica del Sulfolax es de 4 a 6 mg por día.

Otras investigaciones muestran que el Sulfolax no tiene ninguna influencia sobre el Sistema Nervioso Central, Corazón, presión arterial sanguínea, diuresis, glicemia y no presenta "in vitro" actividad antibacteriana ni antifúngica. (1, 6).

MONOGRAFIA DEL SULFOLAX

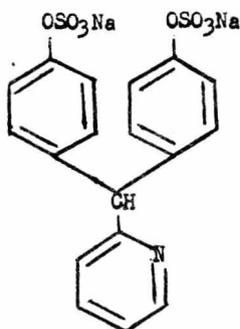
NOMBRE QUIMICO:

Sal sódica del ácido 4,4'-(2 picoliliden) bis fenil sulfúrico.

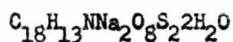
NOMBRE GENERICO:

Picosulfato, Picosulfol, Sulfolax.

FORMULA ESTRUCTURAL



FORMULA CONDENSADA:



PESO MOLECULAR:

517.44

DESCRIPCION:

Polvo de color blanco o ligeramente amarillo, inodoro.

SOLUBILIDAD:

Es soluble en agua, etanol, metanol, en ácidos y álcalis diluidos.

Insoluble en solventes no polares, tales como éter, cloroformo y benceno.

HUMEDAD: 5.61 %

pH : 7.2 (de una solución acuosa al 10 %)

PERDIDA AL SECADO

2.2 % (a 105°C durante 2 horas)

TEMPERATURA DE FUSION

172 - 175 °C

SINTESIS DEL SULFOLAX

El Sulfolax se prepara por condensación del 2-piridinaldehído con fenol, y subsiguiente tratamiento del producto resultante, bis (p-hidroxifenil)-2(piridil) metano, con ácido clorosulfónico.

También se prepara tratando el bis - (p-hidroxifenil)-(2 piridil) metano, mono o dihalogenado en posición orto, con ácido clorosulfónico y en seguida una deshalogenación reductiva con níquel aluminio, en solución alcalina o con níquel-Raney. (6).

III.- PARTE EXPERIMENTAL.

- 1.- Métodos de identificación de Sulfolax.
- 2.- Valoración de Sulfolax materia prima por los métodos:
 - a).- Espectrofotométrico.
 - b).- Volumétrico.
- 3.- Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el método espectrofotométrico.
- 4.- Formulación de una solución y método de valoración de Sulfolax en dicha forma farmacéutica.
 - a).- Resultados y análisis estadístico de los mismos.
- 5.- Métodos de valoración "In Vitro" de Sulfolax materia prima en:
 - a).- Heces
 - b).- Orina
 - c).- Suero de conejo
- 6.- Resultados obtenidos en la valoración de Sulfolax materia prima en: Heces, Orina y Suero de conejo.
- 7.- Análisis estadístico de los resultados anteriores.
- 8.- Métodos de valoración "In Vitro" del Sulfolax de un producto terminado (Solución) en:
 - a).- Heces
 - b).- Orina
 - c).- Suero de conejo
- 9.- Resultados obtenidos en la valoración del Sulfolax de un producto terminado en: Heces, Orina y Suero de conejo.
Análisis estadístico de tales resultados.
- 10.- Determinación "In Vivo" de Sulfolax y su metabolito en:
 - a).- Heces
 - b).- Orina
 - c).- Suero de conejo.
- 11.- Estudio histopatológico de las víceras de los conejos tratados con Sulfolax durante un período largo.

1.- METODOS DE IDENTIFICACION DE SULFOLAX

Identificación química.

Sulfolax dá prueba positiva a las siguientes reacciones para sulfatos:

- a).- Se lleva a ebullición Sulfolax en hidróxido de sodio diluido, se enfría y al agregar una solución de perclorato de Bario, se forma un precipitado blanco de Sulfato de Bario.
- b).- Sulfolax en hidróxido de sodio diluido, se lleva a ebullición, se enfría y se agrega una solución de cloruro de Bario, se observa la formación de un precipitado blanco insoluble en ácido clorhídrico.

Sulfolax también dá prueba positiva a las siguientes reacciones para fenoles.

a).- Sulfolax en ácido Sulfúrico se lleva a ebullición, se enfría y se neutraliza con hidróxido de sodio, luego se agrega solución reactivo de ferricianuro de potasio, produciéndose una coloración violeta.

b).- 500 mg de Sulfolax más 50 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se ponen a reflujo durante 30 minutos, se enfría la solución y se hace la siguiente reacción: Una gota de esta solución en éter es evaporada a sequedad en un crisol y luego tratada con una gota de reactivo recientemente preparado (Solución al 1 por ciento de nitrito de sodio en ácido sulfúrico concentrado), se deja unos minutos y se diluye con una gota de agua. Aparece un color violeta que indica la presencia de fenoles.

IDENTIFICACION AL ULTRAVIOLETA

Una solución de Sulfolax con una concentración de 10 mcg/ml presenta un máximo a 263 nm con una absorción de 0.107

IDENTIFICACION CROMATOGRAFICA

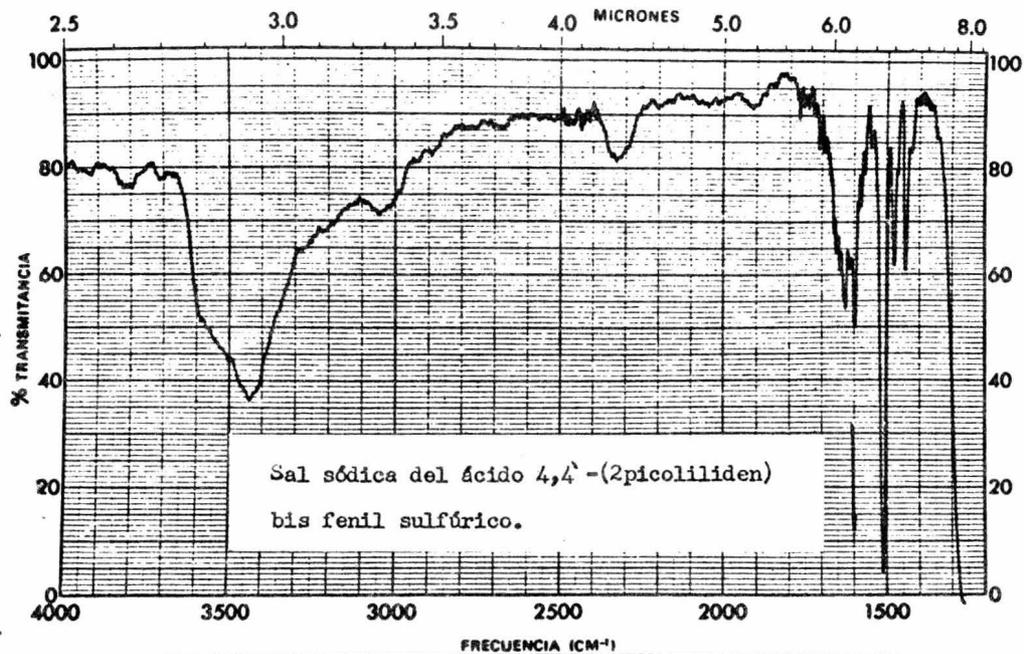
Un volumen de solución acuosa equivalente a 10 mcg de Sulfolax es aplicado sobre una placa de Sílica Gel GF-254, la cual es eluida con una mezcla de Dioxano, agua y cloroformo en las siguientes proporciones: 70:20:10. La placa se revela con luz Ultravioleta. También puede ser revelada con una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico concentrado y una solución acuosa al 3 por ciento de dicromato de potasio. (5)

El Rf teórico del Sulfolax es de 0.33

Valores de Rf obtenidos:	0.3259	
	0.3270	
	0.3333	
	0.3333	
	0.3265	
	0.3320	Rf promedio 0.3295
	0.3275	
	0.3290	
	0.3307	
	0.3300	

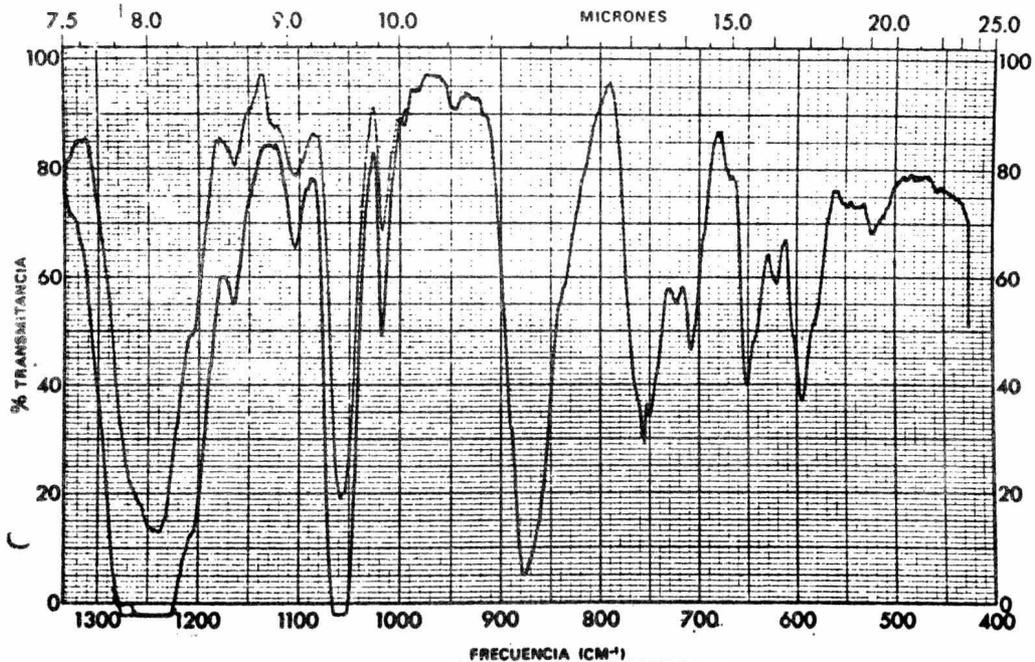
IDENTIFICACION EN EL ESPECTRO DE INFRARROJO

El espectro de infrarrojo muestra dos bandas intensas en 1230 y 1060 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones estiramiento de las uniones S=O de los grupos sulfónicos; una en 870 cm^{-1} correspondiente a las deformaciones del plano de los cuatro grupos de dos hidrógenos adyacentes de los ciclo-bencénicos para sustituidos y una banda de intensidad media en 763 cm^{-1} que corresponde a los cuatro hidrógenos adyacentes del ciclo de piridina alfa sustituido. (5) Espectrogramas en las páginas 12 y 13.



RSB

MUESTRA SULFOLAX MATERIA PRIMA	CUBETA Nº 18545	VEL DE BARRIDO LENTO	OPERADOR
ORIGEN ALBERTA TOXQUI TULA	CONC.	SERIE H	FECHA 29-VII-75
SOLVENTE	ESPESOR DE CELDA	COMENTARIOS PASTILLA	
	REFERENCIA AIRE		



MUESTRA SULPOLAX MATERIA PRIMA	CURVA Nº 18545	VEL. DE BARRIDO LENTA	OPERADOR N
ORIGEN ALBERTA TOXQUI TULA	CONC. -	BARRIDA N	FECHA 29-VII-75
SOLVENTE -	REFERENCIA AIRE	COMENTARIOS FINILLA	

2.- METODO DE VALORACION DE SULFOLAX COMO MATERIA PRIMA

a).- Método espectrofotométrico.

Procedimiento:

Se pesan 50 mg de Sulfolax y se colocan en un matraz de 100 ml, se disuelve y afora. De esta solución se toman 2 ml, se colocan en otro matraz de 100 ml y se afora con agua destilada, se tiene una solución de 10 mcg por ml que se lee al espectrofotómetro a 263 nm.

b).- Método volumétrico.

Procedimiento:

Se pesan 500 mg de Sulfolax y se disuelven en 50 ml de HCl 0.1 N, luego se pone a reflujo durante 30 minutos, después se neutraliza con 50 ml de NaOH 0.1 N y se diluye con precisión a 1000 ml. Se toma una alícuota de 10 ml y se diluye con 20 ml de isopropanol, se titula con Perclorato de Bario 0.02 N usando como indicador Thorin al 2 % en agua libre de CO₂ y tomando como punto final el cambio de amarillo a rosa.

$$\% \text{ de Sulfolax} = \frac{\text{ml de Ba(ClO}_4)_2 \times N \times \text{Factor}}{\text{Peso de la muestra}}$$

Peso de la muestra

3.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACION
ESPECTROFOTOMETRICA DE SULFOLAX MATERIA PRIMA.

	X (%)	X - \bar{X}	(X - \bar{X}) ²
1.-	100.55	0.61	0.3721
2.-	99.62	- 0.32	0.1024
3.-	100.55	0.61	0.3721
4.-	97.76	- 2.18	4.7524
5.-	100.55	0.61	0.3721
6.-	99.62	- 0.32	0.1024
7.-	100.55	0.61	0.3721
8.-	99.62	- 0.32	0.1024
9.-	99.62	- 0.32	0.1024
10.-	100.50	0.31	0.3721
11.-	97.76	- 2.18	4.7524
12.-	100.55	0.61	0.3721
13.-	99.62	- 0.32	0.1024
14.-	100.55	0.61	0.3721
15.-	100.55	0.61	0.3721
16.-	100.55	0.61	0.3721
17.-	99.62	- 0.32	0.1024
18.-	100.55	0.61	0.3721
19.-	99.62	- 0.32	0.1024
20.-	99.62	- 0.32	0.1024
21.-	99.62	- 0.32	0.1024
22.-	98.69	- 1.25	1.5625
23.-	99.62	- 0.32	0.1024
24.-	99.62	- 0.32	0.1024
25.-	100.55	0.61	0.3721
26.-	100.55	0.61	0.3721
27.-	101.48	1.54	2.3716
28.-	100.55	0.61	0.3721
29.-	100.55	0.61	0.3721
30.-	100.55	0.61	0.3721
	\bar{X} 99.84	X - \bar{X} 1.56	(X - \bar{X}) ² 20.14

$$S^2 = \frac{20.14}{29} = 0.694$$

$$S = \sqrt{\frac{20.14}{29}} = 0.833$$

$$e = \frac{0.833}{5.4772} = 0.1520$$

$$C.V. = \frac{0.694 \times 100}{99.84} = 0.695$$

Calibración del método
espectrofotométrico

$$S = 0.833$$

$$e = 0.1520$$

$$C.V. = 0.695$$

Muestra 100 mg

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm e \quad t_{0.95}$$

$$99.84 \pm (0.1520)(2.04)$$

$$99.84 \pm 0.3100$$

4.- FORMULACION DE LA SOLUCION

Sulfolax -----	750 mg
Nipagin -----	180 mg
Nipasol -----	20 mg
Color verde -----	20 mg
Alcohol -----	10 ml
Agua c. b. p.-----	100 ml

METODO DE VALORACION DE SULFOLAX EN LA SOLUCION

Se toma una alícuota de 5 ml y se pasa a un embudo de separación, se hacen 3 extracciones de 10 ml cada una con cloruro de metileno, adicionan do cloruro de sodio para evitar emulsión. Se toman de la fase acuosa 2 ml y se llevan a un matraz aforado de 100 ml para tener una concentración de 150 mcg/ml, de esta solución se toma una alícuota de 5 ml y se lleva a un matraz de 50 ml teniendo una concentración final de 15 mcg/ml. Se prepara al mismo tiempo un patrón con todos los componentes a la misma concentra_ ción y se lee al espectrofotómetro a 263 nm.

a).-ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACION DE SULFOLAX EN LA SOLUCION PROBLEMA.

	X (x̄)	X - X̄	(X - X̄) ²
1.-	96.00	0.07	0.0049
2.-	96.31	0.38	0.1444
3.-	96.64	0.71	0.5041
4.-	96.75	0.82	0.6724
5.-	96.12	0.19	0.0361
6.-	96.83	0.90	0.8100
7.-	95.62	- 0.31	0.9610
8.-	95.62	- 0.31	0.9610
9.-	95.9	- 0.03	0.0009
10.-	95.29	- 0.64	0.4096
11.-	96.47	0.54	0.2916
12.-	96.91	0.98	0.9604
13.-	96.53	0.60	0.3600
14.-	95.78	0.15	0.0225
15.-	96.29	0.36	0.1296
16.-	96.02	0.09	0.0081
17.-	96.47	0.54	0.2916
18.-	97.04	1.11	1.2321
19.-	96.51	0.58	0.3364
20.-	96.40	0.47	0.2209
21.-	97.00	1.07	1.1449
22.-	97.02	1.09	1.1881
23.-	96.75	0.82	0.6724
24.-	97.00	1.07	1.1449
25.-	96.12	0.19	0.0361
26.-	96.29	0.36	0.1296
27.-	96.46	0.50	0.2500
28.-	96.47	0.54	0.2916
29.-	96.51	0.58	0.3364
30.-	96.83	0.90	0.8100
	$\bar{X} = 95.93$	$X - \bar{X} = 14.32$	$(X - \bar{X})^2 = 14.2616$

$$s^2 = \frac{14.2616}{29} = 0.4952$$

$$s = \sqrt{\frac{14.2616}{29}} = 0.7037$$

$$e = \frac{0.7037}{5.4772} = 0.128$$

$$C. V. = \frac{0.4952 \times 100}{95.93} = 0.5162$$

Calibración del método.

$$S = 0.7037$$

$$e = 0.128$$

$$C.V. = 0.5162$$

Muestra 37.5 mg

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm e \quad t_{0.95}$$

$$95.93 \pm (0.128)(2.04)$$

$$95.93 \pm 0.2611$$

5.- a).- VALORACION DE SULFOLAX (MATERIA PRIMA) EN UN EXTRACTO DE HECES
DE CONEJO "IN VITRO" POR CROMATOGRAFIA EN PLACA

Procedimiento:

En un matraz de 100 ml se colocan 100 mg de Sulfolax y se afora con un extracto etanólico de heces, de esta solución se toma una muestra de 100 mcl y se aplica sobre una placa de 20 X 20 cm con una cubierta de Sílica Gel GF-254 con un espesor de 250 micras, activada a 110°C durante una hora. En la misma placa se aplica una muestra de 100 mcl de extracto de heces --- (blanco) y otra muestra de 100 mcl de un estándar de materia prima. La placa se coloca en una cámara de vidrio previamente saturada con un sistema de elución formado por los solventes: dioxano, agua y cloroformo en las proporciones de 70:20:10 respectivamente. Se deja correr el solvente 15 cm, se saca la placa y se evapora el solvente, luego se revela con luz Ultravioleta de $\lambda = 254 \text{ nm}$, apareciendo una mancha de color violeta con un Rf de 0.33. La mancha se raspa y se diluye con 10 ml de agua destilada, teniendo en la solución final una concentración 10 mcg/ml, se agita y centrifuga, luego se lee en un espectrofotómetro a 263 nm. Se usa un blanco y la lectura se compara con el estándar de materia prima que se corre al mismo tiempo. (1, 2, 5).

b).- VALORACION DE SULFOLAX (MATERIA PRIMA) EN ORINA DE CONEJO
"IN VITRO" POR CROMATOGRAFIA EN PLACA

Procedimiento:

Se colocan 100 mg de Sulfolax en un matraz de 100 ml y se afora con orina de conejo, de esta solución se toma una muestra de 100 mcl y se aplica en una placa de 20 X 20 cm cubierta con una capa de Sílica Gel GF-254 con un espesor de 250 micras activada a 110°C durante una hora. En la misma placa se aplica una muestra de 100 mcl de orina (blanco) y otra muestra de 100 mcl de un estándar de materia prima. La placa se coloca en una cámara de vi

drio previamente saturada con un sistema de elución formado por dioxano, agua y cloroformo en las siguientes proporciones: 70:20:10. Se deja correr el solvente 15 cm, se saca la placa y se evapora el solvente, luego se revela con luz Ultravioleta y el análisis se continúa como en el método para heces. (1, 2, 5)

c).- VALORACION DE SULFOLAX (MATERIA PRIMA) EN SUERO DE CONEJO
"IN VITRO" POR CROMATOGRAFIA EN PLACA

Procedimiento:

Se toma un volumen de sangre y se centrifuga para separar el suero. Se prepara una solución alcohólica de Sulfolax con una concentración de -- 5000 mcg/ml.

Se toma un ml de suero, se coloca en un tubo de ensaye y se agrega un ml de la solución de Sulfolax, se agita y se agregan 3 ml de etanol absoluto para precipitar las proteínas y extraer el Sulfolax. Se agita y centrifuga. Del sobrenadante se toma una muestra de 100 mcl y se aplica sobre una placa de 20 X 20 cm cubierta con una capa de Sílica Gel GF-254 con un espesor de 250 micras, activada a 110°C durante una hora. En la misma placa se aplica una muestra de 100 mcl de suero (blanco) y otra muestra de 100 mcl de un estándar de materia prima. La placa se coloca en una cámara de vidrio saturada con el sistema de elución utilizado en los métodos anteriores. Se deja correr el solvente 15 cm, se saca la placa y se evapora el solvente. Se revela con luz Ultravioleta de $\lambda = 254 \text{ nm}$, apareciendo una mancha de color violeta con el Rf característico del Sulfolax. El análisis se continúa como en el método a) para heces. (1,2,5)

6.- Resultados obtenidos en la valoración de Sulfolax materia prima en:
heces, orina y suero de conejo, por el método de cromatografía en placa fina.

HECES

	X (%)		X - \bar{X}		(X - \bar{X}) ²	
1.-	99.81	101.80	- 0.18	1.81	0.0324	3.2761
2.-	99.81	100.90	- 0.18	0.91	0.0324	0.8281
3.-	96.04	99.09	- 3.95	- 0.90	15.6025	0.8100
4.-	103.57	101.80	3.58	1.81	12.8164	3.2761
5.-	100.75	96.39	0.76	- 3.60	0.5776	12.9600
6.-	96.80	98.90	- 3.19	- 1.09	10.1761	1.1881
7.-	102.69	102.56	2.70	2.56	7.2900	6.5536
8.-	103.53	101.64	3.54	1.65	12.5316	2.7225
9.-	98.48	97.98	- 1.51	- 2.01	2.2801	4.0401
10.-	98.48	98.90	- 1.51	- 1.09	2.2801	1.1881
$\bar{X} = 99.99$						

ORINA

	X (%)		X - \bar{X}		(X - \bar{X}) ²	
1.-	100.00	99.24	- 0.09	- 0.85	0.0081	0.7225
2.-	99.20	100.00	- 0.89	0.09	0.7921	0.0081
3.-	100.00	102.25	- 0.09	2.16	0.0081	4.6656
4.-	100.79	96.99	0.70	- 3.1	0.4900	9.6100
5.-	100.00	101.50	0.09	1.41	0.0081	1.9800
6.-	98.23	99.27	- 1.77	- 0.82	3.1329	0.6724
7.-	101.17	102.91	1.08	2.82	1.1664	7.9524
8.-	102.16	97.44	2.07	- 2.65	4.2849	7.0225
9.-	102.16	102.00	2.07	1.91	4.2849	3.6481
10.-	98.23	98.36	- 1.86	- 1.73	3.4596	2.9929
$\bar{X} = 100.09$						

SUERO

	X (%)		X - \bar{X}		(X - \bar{X}) ²	
1.-	99.08	100.52	- 0.9	0.54	0.8100	0.2916
2.-	99.08	102.27	- 0.9	2.29	0.8100	5.2441
3.-	100.91	98.77	0.93	- 1.21	0.8649	1.4641
4.-	100.91	96.15	0.93	- 3.83	0.8649	14.6689
5.-	100.00	102.27	0.02	2.29	0.0004	5.2441
6.-	99.27	101.14	- 0.71	1.16	0.5041	1.3456
7.-	102.00	97.06	2.02	- 2.92	4.0804	8.5264
8.-	100.18	100.32	0.2	0.34	0.0400	0.1156
9.-	96.53	102.77	- 3.45	2.79	11.9025	7.7841
10.-	102.00	98.69	2.02	- 1.29	4.0804	1.6641
$\bar{X} = 99.98$						

7.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN HECES, ORINA

Y SUERO.

HECES
$$S^2 = \frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{100.461}{19} = 5.28$$

$$S = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{5.28} = 2.297$$

$$e = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{2.297}{4.472} = 0.513$$

$$C.V. = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = \frac{2.297 \times 100}{99.99} = 2.297$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm e t_{0.95}$$

$$99.99 \pm (0.513)(2.09)$$

$$99.99 \pm 1.072$$

ORINA
$$S^2 = \frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{56.909}{19} = 2.995$$

$$S = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{2.995} = 1.73$$

$$e = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{1.73}{4.472} = 0.3868$$

$$C.V. = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = \frac{1.73 \times 100}{100.09} = 1.728$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm e t_{0.95}$$

$$100.09 \pm (0.3868)(2.09)$$

$$100.09 \pm 0.8084$$

SUERO
$$S^2 = \frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{70.3062}{19} = 3.70$$

$$S = \sqrt{\frac{(X - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{3.7} = 1.923$$

$$e = \frac{S}{\sqrt{n}} = \frac{1.923}{4.472} = 0.4300$$

$$C.V. = \frac{S \times 100}{\bar{X}} = \frac{1.923 \times 100}{99.98} = 1.923$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm e t_{0.95}$$

$$99.98 \pm (0.4300)(2.09)$$

$$99.98 \pm 0.8987$$

8.- VALORACION DE SULFOLAX DE LA SOLUCION PROBLEMA EN: HECES, ORINA Y SUERO DE CONEJO, POR CROMATOGRAFIA EN PLACA.

a).- HECES

Procedimiento:

Se toma un volumen de solución equivalente a 100 mg de Sulfolax, se coloca en un matraz de 100 ml y se afora con un extracto etanólico de heces, de esta solución se toma una muestra de 100 mcl y se aplica sobre una placa de 20 X 20 cm con una capa de 250 micras de espesor de Sílica Gel GF - 254 y activada a 110° C durante una hora. En la misma placa se aplica una muestra de 100 mcl de extracto de heces (blanco) y otra muestra de 100 mcl de un estándar de materia prima. La placa se coloca en una cámara de vidrio saturada con un sistema de elución formado por los solventes: dioxano, agua y cloroformo en las siguientes proporciones 70:20:10. Se deja correr el solvente 15 cm, se saca la placa y se deja secar, luego se revela con luz Ultravioleta ($\lambda=254$ nm) apareciendo una mancha de color violeta con un Rf de 0.33, la cual se raspa y se diluye con 10 ml de agua destilada, se agita y centrifuga. La solución final teniendo una concentración de 10 mcg/ml se lee en el espectrofotómetro a 263 nm, usando un blanco y comparando con el estándar que se corre al mismo tiempo. (1, 2, 5)

b).- ORINA

Procedimiento:

Se toma un volumen de solución equivalente a 100 mg de Sulfolax, se coloca en un matraz de 100 ml y se aplica sobre una placa de 20 X 20 cm con una capa de 250 micras de espesor de Sílica Gel GF-254 y activada a 110°C durante una hora. En la misma placa se aplica una muestra de 100 mcl de orina (blanco) y otra muestra de 100 mcl de un estándar de materia prima.

La placa se coloca en una cámara de vidrio saturada con los solventes del sistema de elución mencionado en el método anterior. Se deja correr el solvente 15 cm, luego se saca la placa y se deja secar, se revela con luz Ultravioleta de $\lambda=254$ nm apareciendo una mancha de color violeta correspondiente al Sulfolax. La mancha se raspa y el análisis se continúa como en el método anterior para heces. (1, 2, 5)

c).- SUERO

Procedimiento:

Se toma un volumen de solución equivalente a 500 mg de Sulfolax, se coloca en un matraz de 100 ml y se afora con agua destilada. De esta solución que tiene una concentración de 5000 mcg/ml, se toma una muestra de 1 ml y se coloca en un tubo de ensaye que contiene 1 ml de suero, en seguida se adicionan 3 ml de etanol para precipitar las proteínas, se agita y centrifuga; del sobrenadante se toman 100 mcl y se aplican sobre una placa de 20 X 20 cm con una capa de 250 micras de espesor de Sílica Gel GF-254 y activada a 110° C durante una hora. En la misma placa se aplica una muestra de 100 mcl de suero (blanco) y otra muestra de 100 mcl de un estándar de materia prima. La placa se coloca en una cámara de vidrio previamente saturada con el sistema de elución ya mencionado en (a). Se deja correr el solvente 15 cm, se saca la placa y se deja secar, luego se revela con luz Ultravioleta de $\lambda=254$ nm apareciendo una mancha de color violeta con el Rf correspondiente al Sulfolax. La mancha se raspa y el análisis se continúa como en el método para heces. (1, 2, 5)

9.- Resultados obtenidos en la valoración de Sulfolax de la solución problema en: heces, orina y suero de conejo, por el método de cromatografía en placa.

<u>HECES</u>	X (%)		X - \bar{X}		(X - \bar{X}) ²	
1.-	98.29	97.39	- 0.87	- 1.77	0.7569	3.1329
2.-	100.80	99.10	1.64	- 0.06	2.6896	0.0036
3.-	100.00	101.70	0.84	2.54	0.7056	6.4516
4.-	97.40	98.26	- 1.76	- 0.90	3.0976	0.8100
5.-	100.80	100.80	1.64	1.64	2.6896	2.6896
6.-	96.70	101.80	- 2.46	2.64	6.0516	6.9696
7.-	99.10	99.00	- 0.06	- 0.16	0.0036	0.0256
8.-	95.90	100.00	- 3.26	0.84	10.6276	0.7056
9.-	100.80	97.27	1.64	- 1.89	2.6896	3.5721
10.-	100.00	98.18	0.84	- 0.98	0.7056	0.9604
$\bar{X} = 99.16$						

<u>ORINA</u>	X (%)		X - \bar{X}		(X - \bar{X}) ²	
1.-	98.42	101.60	1.35	1.83	1.8225	3.3489
2.-	100.78	101.60	1.01	1.83	1.0201	3.8439
3.-	97.63	99.10	- 2.14	- 0.67	4.5796	0.4484
4.-	100.00	100.00	0.23	0.23	0.0529	0.0529
5.-	100.78	98.30	1.01	1.47	1.0201	2.1609
6.-	101.62	99.10	1.85	- 0.67	3.4225	0.4489
7.-	99.18	100.80	- 0.59	1.03	0.3481	1.0609
8.-	97.56	102.40	- 2.21	2.63	4.8841	6.9169
9.-	101.62	97.50	1.85	- 2.27	3.4225	5.1529
10.-	99.18	98.30	- 0.59	- 1.47	0.3481	2.1609
$\bar{X} = 99.77$						

<u>SUERO</u>	X (%)		X - \bar{X}		(X - \bar{X}) ²	
1.-	97.20	101.76	- 1.98	2.58	3.9204	6.6564
2.-	100.90	99.11	1.72	- 0.07	2.9584	0.0004
3.-	100.00	100.00	0.82	0.82	0.6724	0.6724
4.-	101.80	98.23	2.62	- 0.95	6.8644	0.9025
5.-	98.16	98.23	- 1.02	- 0.95	1.0404	0.9025
6.-	99.09	101.70	- 0.09	2.52	0.0081	6.3504
7.-	97.27	97.43	- 1.91	- 1.75	3.6481	3.0625
8.-	99.09	102.56	- 0.09	3.38	0.0810	11.4244
9.-	96.36	99.14	- 2.82	- 0.04	7.9524	0.0016
10.-	98.18	97.47	- 1.00	- 1.71	1.0000	2.9241
$\bar{X} = 99.18$						

ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA VALORACION DE SULFOLAX EN PRODUCTO TERMINADO (SOLUCION).

HECES

$$\bar{X} = 99.16$$

$$s^2 = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{55.338}{19} = 2.91$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{2.91} = 1.705$$

$$e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{1.705}{4.472} = 0.3812$$

$$C.V. = \frac{s \times 100}{\bar{X}} = \frac{1.705 \times 100}{99.16} = 1.7194$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm |e| \cdot t_{0.95}$$

$$99.16 \pm (0.3812)(2.09)$$

$$99.16 \pm 0.7967$$

ORINA

$$\bar{X} = 99.77$$

$$s^2 = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{46.021}{19} = 2.422$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{2.422} = 1.556$$

$$e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{1.556}{4.472} = 0.3479$$

$$C.V. = \frac{s \times 100}{\bar{X}} = \frac{1.556 \times 100}{99.77} = 1.55$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm |e| \cdot t_{0.95}$$

$$99.77 \pm (0.3479)(2.09)$$

$$99.77 \pm 0.7271$$

SUERO

$$\bar{X} = 99.18$$

$$s^2 = \frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1} = \frac{61.042}{19} = 3.212$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n - 1}} = \sqrt{3.212} = 1.792$$

$$e = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{1.792}{4.472} = 0.4007$$

$$C.V. = \frac{s \times 100}{\bar{X}} = \frac{1.792 \times 100}{99.18} = 1.806$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm |e| \cdot t_{0.95}$$

$$99.18 \pm (0.4007)(2.09)$$

$$99.18 \pm 0.8374$$

MEDIDAS DE DISPERSION OBTENIDAS EN LA CALIBRACION DE LOS METODOS

	S	S ²	Te	C.V.
Valoración de Sulfolax				
materia prima, en heces.	5.28	2.297	0.513	2.297
Valoración de Sulfolax				
materia prima, en orina.	2.995	1.73	0.3868	1.728
Valoración de Sulfolax				
materia prima, en suero.	3.70	1.923	0.4300	1.923
Valoración de Sulfolax				
de un producto terminado -				
(Solución) en heces.	2.91	1.705	0.3812	1.719
Valoración de Sulfolax				
de un producto terminado -				
(Solución) en orina.	2.422	1.556	0.3479	1.55
Valoración de Sulfolax				
de un producto terminado -				
(Solución) en suero.	3.212	1.792	0.4007	1.806

10.- DETERMINACION "IN VIVO" DE SULFOLAX Y SU METABOLITO EN
HECES, ORINA Y SUERO DE CONEJO.

ADMINISTRADO COMO PRODUCTO TERMINADO (SOLUCION)

Para determinar el Sulfolax eliminado como tal y como metabolito -
(4,4-dihidroxdifenil-(2piridil) metano, se siguió un procedimiento basa_ do en los métodos cromatográficos reportados por: G. Coppi y E. Crescenzi en 1966 y Perego, R., Martinelli, E. et al en 1969.

a).- HECES

Procedimiento:

Se emplearon conejos machos de 2.5 Kg de peso a los que se les admi_ nistró una dosis de 5 mg de Sulfolax por día, después de permanecer en a_ yuno absoluto durante 18 horas. A las 48 horas después de la administra_ ción se tomaron muestras de excrementos y orina, las cuales fueron anali_ zadas en la forma siguiente:

Los excrementos de un conejo correspondientes a 48 horas fueron tra_ tados con etanol para extraer el Sulfolax, el volumen obtenido fue evapo_ rado hasta tener un volumen de 250 ml conteniendo una concentración de 20 mcg/ml si se eliminara totalmente por heces. De esta solución se tomaron - 50 ml y se evaporaron hasta obtener un volumen de 10 ml, con una concen_ tración de 100 mcg/ml.

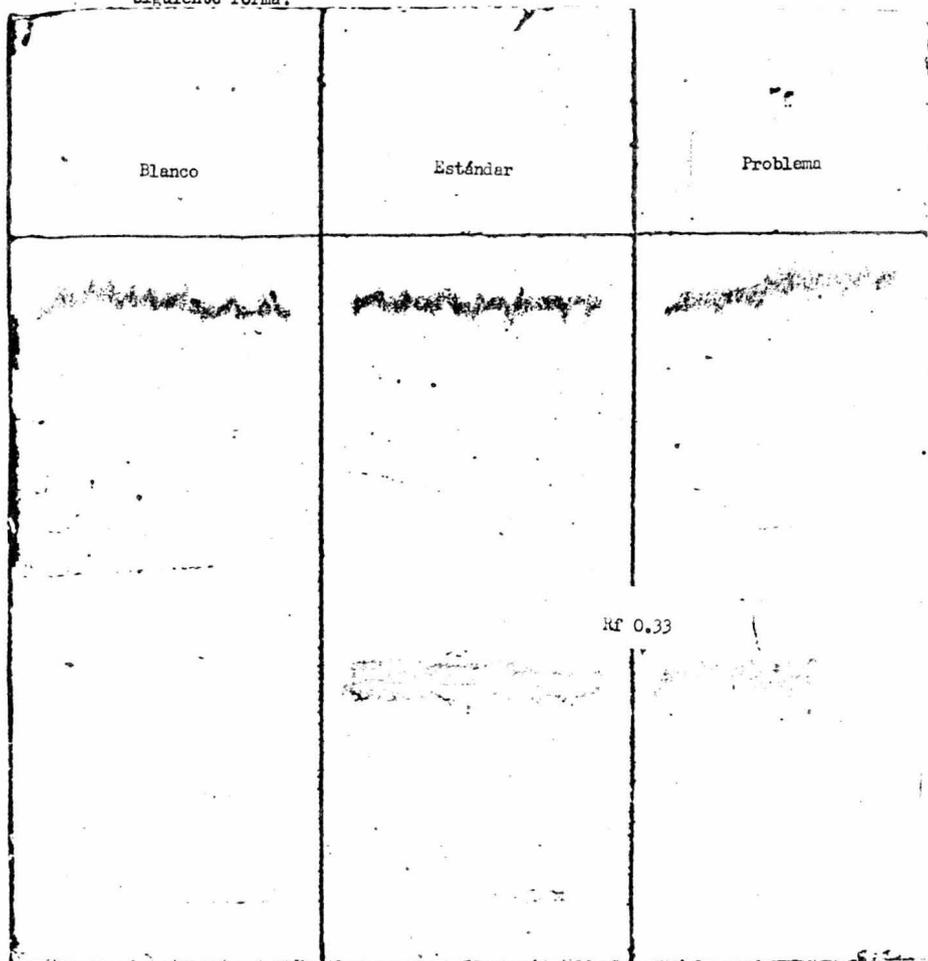
Preparación de un estándar:

Los excrementos correspondientes a 48 horas de un conejo control, - fueron extraídos en igual forma y se aforó a 250 ml, de aquí se tomaron - 50 ml a los cuales se añadieron 1000 mcg de Sulfolax y se evaporaron has_ ta obtener un volumen de 10 ml con una concentración de 100 mcg/ml.

Se preparó un blanco con 50 ml del extracto anterior evaporando has_ ta 10 ml.

Aplicación de las muestras.

En una placa cromatográfica de 20 X 20 cm, con una cubierta de Sílica Gel GF-254 de 500 micras de espesor, se aplicaron muestras de 1 ml en la siguiente forma:



Las manchas fueron raspadas de la placa y el polvo fue colocado en tubos de ensaye y analizado por el método mencionado en 5.- a) para heces.

RESULTADOS OBTENIDOS

Conejos	Muestra	Porcentaje eliminado
1	1	63 %
2	1	62.8 %
3	1	63.5 %

Análisis estadístico de los resultados obtenidos "in vivo".

$$\bar{X} = 63.1 \%$$

X (%)	X - \bar{X}	(X - \bar{X}) ²
63	- 0.1	0.01
62.8	- 0.3	0.09
63.5	0.4	0.16
		$\Sigma (X - \bar{X})^2 = 0.26$

$$S^2 = \frac{0.26}{3} = 0.0866$$

$$S = \sqrt{0.0866} = 0.2942$$

$$e = \frac{0.2942}{1.732} = 0.1698$$

$$C.V. = \frac{0.2942 \times 100}{63.1} = 0.4662$$

LIMITES DE CONFIANZA

$$\bar{X} \pm e \cdot t_{0.95}$$

$$63.1 \pm (0.1698)(4.30)$$

$$63.1 \pm 0.7301$$

Identificación del 4,4'-dihidroxi-difenil -(2piridil) metano, metabolito en heces.

Para identificar el metabolito se hizo lo siguiente:

500 mg de Sulfolax se llevaron a reflujo con 50 ml de HCl 0.1 N durante media hora. Esta solución dió prueba positiva a las reacciones para fenoles y sulfatos, también se aplicó sobre placa cromatográfica, corriendo al mismo tiempo un estándar de materia prima. La placa fue eluída con éter y se observó que la muestra de Sulfolax permaneció en el punto de aplicación, en cambio la muestra puesta a reflujo presentó una mancha de color violeta con un valor de Rf de 0.538

Rf	0.5395
	0.5387
	0.5400
	0.5395
	0.5397
	0.5389
	0.5392
	0.5375
	0.5382
	0.5387

El Rf teórico del 4,4'-dihidroxi-difenil -(2 piridil) metano, es de 0.54 (2.)

Identificación del metabolito en heces (Problema).

Se aplicó 1 ml del extracto de heces problema en una placa cromatográfica y en la misma 1 ml de la solución sometida a reflujo. La placa fue eluída con éter y luego revelada con luz Ultravioleta, el resultado fue negativo para el problema, mientras que la muestra de solución sometida a reflujo, presentó una mancha de color violeta con el Rf antes mencionado. La misma placa fue revelada con una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico y una solución acuosa al 3 por ciento de dicromato de potasio, con la cual el resultado fue también negativo.

b).- DETERMINACION DE SULFOLAX Y SU METABOLITO EN ORINA

Determinación de Sulfolax.

La orina colectada durante 48 horas, fue un volumen de 400 ml aproximadamente, el cual teóricamente debía tener una concentración de 12.5 mcg por ml, si el Sulfolax se eliminara totalmente por orina.

Un ml de orina previamente filtrada se aplicó sobre una placa cromatográfica y en la misma placa 1 ml de orina de conejo control (blanco) y 1 ml de un estándar. La placa fue eluída con una mezcla de Dioxano, agua y cloroformo en las proporciones siguientes 70:20:10, se reveló con luz Ultravioleta y el resultado fue negativo. Se usó un revelador que es capaz de detectar concentraciones de 1 mcg, pero el resultado también fue negativo.

El Sulfolax presenta una mancha de color violeta con un valor de R_f de 0.33

Determinación del 4,4'-dihidroxi-difenil-(2piridil) metano, en orina

En caso de producirse una hidrólisis durante el paso por el tracto gastrointestinal, se podría detectar el metabolito en placa por su R_f , revelando con luz Ultravioleta o con una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico concentrado y una solución acuosa al 3 por ciento de dicromato de potasio con la que se pueden revelar concentraciones de 1 mcg. También podríamos indicar su presencia por medio de reacciones para fenoles.

Se efectuaron las siguientes reacciones:

A la orina de conejo control se le añadió Sulfolax y ácido sulfúrico concentrado, se llevó a ebullición, se enfrió y se le agregó hidróxido de sodio para neutralizar, luego se añadió la solución reactivo de ferricianuro de potasio, obteniéndose una coloración violeta que indicó la presencia de fenoles.

Un volumen de orina problema con ácido sulfúrico concentrado se llevó a ebullición, con lo cual en caso de estar presente el Sulfolax se produciría la hidrólisis, y con las reacciones para fenoles se pudo comprobar la ausencia del 4,4'-dihidroxi-difenil -(2piridil) metano.

Unas gotas de orina problema en éter se evaporaron a sequedad, el residuo se diluyó con una gota de agua y luego se agregó una gota de reactivo recientemente preparado (Solución de nitrito de sodio al 1 por ciento en ácido sulfúrico concentrado), el resultado fue negativo.

Las pruebas para sulfatos fueron positivas tanto en la orina problema como en la orina control, debido a que la orina del conejo tiene gran cantidad de sales entre ellas sulfatos.

Según estas pruebas el Sulfolax no se encuentra en la orina como tal ni como 4,4'-dihidroxi-difenil -(2piridil) metano, compuesto que resulta de la hidrólisis del Sulfolax.

c).- DETERMINACION CUALITATIVA DE SULFOLAX Y SU METABOLITO EN SUERO

DE CONEJO

A un conejo de 2.5 Kg de peso se le administró una dosis de 25 mg de Sulfolax. A las 3 horas y media después de la administración se le practicó una punción cardiaca extrayendo 20 ml de sangre.

La sangre fue tratada en la siguiente forma:

Los 20 ml fueron centrifugados para separar el paquete globular obteniendo un volumen de suero de 8 ml correspondientes al 40 por ciento del volumen total. Un conejo de 2.5 Kg tiene un volumen de sangre de 200-ml aproximadamente. Si el Sulfolax en el tiempo antes mencionado hubiera pasado completamente a la sangre debía haber una concentración de 125 mcg por ml y entonces en los 20 ml de sangre tendríamos 2500 mcg y como al centrifugar sólo se obtuvo un volumen de 8 ml, la concentración teórica de Sulfolax en este volumen sería de 312.5 mcg/ml.

Al suero se le añadió etanol para precipitar las proteínas y se centrifugó nuevamente. El volumen obtenido se evaporó hasta tener un volumen de 10 ml, en donde tendríamos teóricamente una concentración de 250 mcg por ml. Un ml de esta solución fue aplicado en placa de Sílica Gel GF-254 y activada a 110°C durante una hora. En la misma placa se aplicó 1 ml de un estándar de materia prima. La placa se colocó en una cámara de vidrio previamente saturada con el sistema de elución ya mencionado en los métodos anteriores. La placa fue revelada con luz Ultravioleta y con una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico concentrado y una solución acuosa al 3 por ciento de dicromato de potasio. En ambos casos el resultado fue negativo.

Al suero se le hicieron pruebas de sulfatos y fenoles, las mismas mencionadas en orina obteniéndose resultados negativos.

Determinación cualitativa del 4,4'-dihidroxi-difenil-(2piridil) metano.

Un ml de suero fue aplicado en placa cromatográfica y se utilizó éter como eluyente, al mismo tiempo se corrió una muestra de Sulfolax hidrolizado. Al revelar se observó una mancha de color violeta con un valor de R_f de 0.54 en donde fue aplicada la muestra de Sulfolax hidrolizado, mientras que donde se aplicó la muestra de suero problema no se observó mancha alguna.

Por los resultados obtenidos se puede decir que el Sulfolax no se hidroliza al pasar por el tracto gastrointestinal, basando esto también en un estudio de la estabilidad de este compuesto en el cual demostró ser estable a temperaturas de 60, 70 y 90°C, que en el organismo no son alcanzadas ni las condiciones en las que puede sufrir hidrólisis como son el medio ácido y el reflujo. (2, 9)

11.- ESTUDIO HISTOPATOLOGICO

Para verificar los resultados se hizo lo siguiente:

Un grupo de conejos fue tratado con una dosis de 15 mg de Sulfolax - diariamente durante 46 días, después de los cuales, los conejos fueron sometidos a un estudio histopatológico, realizado en el departamento de Anatomía Patológica de la U.N.A.M. en el Hospital General de la S.S.A. y efectuado sobre hígado, riñones e intestinos.

El tubo digestivo fue explorado macroscópicamente desde el esófago - hasta el recto, no habiendo encontrado anormalidades, sólo se observó una ligera dilatación donde se encontraron heces fecales semipastosas. La mucosa a lo largo del esófago, intestino delgado, intestino grueso y estómago no mostró alteraciones.

Se estudiaron cortes microscópicos de Hígado, riñones, intestino delgado e intestino grueso.

Descripción microscópica.

Hígado.- Los cordones de hepatocitos no mostraron alteraciones.

Riñón.- Se observaron túbulos y glomérulos sin alteraciones.

Intestino delgado.- Se observó la mucosa, submucosa, muscular y serosa sin alteraciones.

Intestino grueso.- No existen cambios microscópicos en las diferentes capas constitutivas de este órgano.

A otro grupo de conejos tratado con la misma dosis durante 63 días - también se le hizo el estudio histopatológico obteniéndose los siguientes resultados:

Se exploraron macroscópicamente y microscópicamente los órganos abdominales. El tubo digestivo, desde el intestino delgado al recto no presentó alteraciones.

Se estudiaron cortes microscópicos de: Hígado, riñones, intestino -

delgado e intestino grueso.

Descripción microscópica.

Hígado.- Se observaron las láminas de hepatocitos, los espacios porta así como los centrolobulillares sin alteraciones.

Riñones.- Se observaron los glomérulos y túbulos sin alteraciones.

Intestino delgado.- La mucosa, submucosa, muscular y serosa no mostraron alteraciones.

Intestino grueso.- No hubo cambios microscópicos en todas las capas constitutivas de este órgano.

El grupo control de animales que no recibió el Sulfolax no presentó ninguna diferencia en los órganos examinados.

Este estudio confirma que el Sulfolax no produce alteraciones demostrables morfológicamente con el microscopio de luz y las técnicas histológicas habituales para el conejo, cuando dicho fármaco es administrado por vía oral durante un tiempo prolongado.

Síntomas presentados en los conejos tratados con Sulfolax.

Los conejos al recibir un volumen de la solución de Sulfolax (dosis terapéutica en humanos) se observó un ligero ablandamiento de los excrementos, pero más abundantes comparados con los excrementos de los conejos control.

Los conejos con dosis 5 veces mayor a la anterior presentaron un ligero aumento en la humedad de los excrementos, abundancia de los mismos y hemorragia.

Otro grupo de conejos sometido a una dosis 3 veces mayor a la terapéutica, diariamente durante 63 días, en este tratamiento los conejos presentaron excrementos blandos y abundantes, además no se observó aumento de peso durante este período, mientras que en los conejos control sí hubo tal aumento.

IV.- CONCLUSION

El presente estudio fue encaminado a comprobar que el Sulfolax no se absorbe, ni se hidroliza al pasar por el tracto gastrointestinal, así como para confirmar la no toxicidad del mismo por medio de las manifestaciones patológicas indagadas en los conejos tratados.

El fármaco estudiado fue valorado por un método volumétrico con perclorato de Bario, obteniéndose una pureza de 99%.

El método espectrofotométrico para Sulfolax materia prima y Sulfolax de la solución problema, en el análisis estadístico de los resultados obtenidos con límites de confianza de 5% de influencia al azar demostró ser aceptable.

Las pruebas "in vitro" para Sulfolax materia prima y Sulfolax de la solución problema, mezclándolo con los materiales biológicos, heces, orina y suero de conejo, separado de tales sustancias por cromatografía en placa y cuantificado por el método espectrofotométrico. Los resultados obtenidos en el estudio estadístico indicaron que los límites de confianza con un 5% de probabilidad son aceptables.

En las pruebas "in vivo" las muestras analizadas por los métodos previamente calibrados, se obtienen valores de recuperación promedio de 63.1 por ciento de Sulfolax eliminado por heces.

Las causas por las cuales sólo se obtiene este porcentaje pueden atribuirse a que el fármaco sea retenido en algunos sitios de la mucosa intestinal y se elimine después de 48 horas, en la toma de la muestra y durante la realización del análisis hay posibilidades de pérdida.

Los resultados obtenidos en la valoración de Sulfolax "in vivo" analizados estadísticamente tienen límites de confianza aceptables con un 5% de probabilidad.

Finalmente el estudio histopatológico confirma la no absorción del - Sulfolax, por no encontrarse alteraciones en los órganos vitales (hígado- y riñones), lo cual al mismo tiempo demuestra la no toxicidad del fármaco.

V.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- Pala, G., Coppi, G. and Crescenzi, E. : On the Laxative Properties of Sulfuric Esters of Phenols, with particular reference to 4,4 -(2 picolylidene)-bis-phenylsulfuric acid disodium salt (Picosulfol). Arch. - Int. Pharmacodyn, 164 (2): 356 - 369, Dic. 1966.
- 2.- Perego, R., Martinelli, E. et al: On the metabolic Disposition of Sodium Picosulfate in rats. *Arzneim. Forsch. (Drug. Res.)* 19: 1889 - 90 1969.
- 3.- Morandi, G., Gabonari, B., Giorgio Michlotti Pier. : Esperienze sull uso del sodio Picosulfato in puerperio. *La clinica terapeutica, Estratto del Vol. 51 Fasc., 3, pag 257 - 265, Nov. 15, 1969.*
- 4.- S. Loewe and M. Hubacher. : Laxative Activity of compounds of the diphenylmethane group in the Rhesus Monkey. *Arch. Int. Pharmacodyn., - 1941, LXV, No. 3.*
- 5.- Pala, G., Crescenzi, E. et Bietti, G. : Sur une nouvelle synthese et les caracteristiques chimico-physiques du picolylidene-2-bis-(p-phenylsulfate de sodium) (DCI) "Picosulfato de Sodium". *Helvetica Chimica Acta - Vol. 51 Fasc. 5 (1968).*
- 6.- Sodio Picosulfato. *Medicamentos de actualidad, VIII (8): 301 - 303, - 1972.*
- 7.- Max H., Hubacher and Sidney Doernberg: Relationship between structure and potency. *J. Pharm. Sciences, 53: 1067 - 1072, September 1964.*
- 8.- Joseph R. Dipalma, M. D. : *Drills Pharmacology in medicine. Ed. -- fourth. Cap. 47 pag. 975 - 989, 1971.*
- 9.- Rosa Eugenia Reyes Reyes : *Tesis Profesional Fac. Quimica U.N.A.M -- México, 1976.*

- 10.- Bruzzese T., Gai A., Riva M., II Farmaco, Ed. Sc., 28, 121; 1973
- 11.- Bruzzese T., Pellegrini R., II Farmaco, Ed. Sc. Vol. 28, 987; 1973