

ACTIVIDAD HEMOLITICA Y SECUENCIA ESTRUCTURAL DE LAS SERIES ALFA-ARIL, OXIALQUIL E ISOXAZOIL - PENICILINAS

Por M. Sierra de Castro

INDICE

I. INTRODUCCION.—1.1. Generalidades.—II. REVISION BIBLIOGRAFICA.—2.1. Agentes hemolíticos antibacterianos.—2.1.1. Antibióticos y Sulfamidas.—2.1.2. Fenoles.—2.1.3. Alcoholes.—2.1.4. Tensoactivos.—2.1.5. Mercuriales.—2.1.6. Parabenos y Formaldehído Sulfoxilato Sódico.—2.1.7. Cloruros de Alquil-Dimetil-Bencil-Amonio.—2.2. Soluciones isotónicas.—2.3. Polietilenglicoles. (PEG).—2.4. Dimetil Sulfoxido. (DMSO).—III. PARTE EXPERIMENTAL.—3.1. Material y Métodos.—3.1.1. Animales.—3.2. Compuestos utilizados; preparación y pureza.—3.2.1. α -aril-oxialquil-penicilinas.—3.2.2. Isoxazoil-penicilinas.—3.2.3. Polietilenglicoles (PEG) 600 y 1.540.—3.2.4. Dimetil Sulfoxido (DMSO).—3.2.5. Cloruro Sódico.—3.3. Aparatos.—3.4. Métodos.—3.4.1. Preparación de las disoluciones.—3.4.2. Recogidas de sangre.—3.4.3. Comprobación de la Ley de Lambert-Beer.—3.4.4. Determinación cuantitativa del grado de hemólisis.—IV. RESULTADOS.—4.1. Hemólisis producida por penicilinas. 4.1.1. Actividad hemolítica de los diastereoisómeros.—4.1.2. Influencia de la concentración de sangre.—4.2. Efecto del pH de las disoluciones sobre la presión osmótica intracelular.—4.3. Coeficiente de Van't HOFF.—4.3.1. Expresión de los términos de actividad.—4.3.2. Cálculo del valor de «i».—4.3.3. Valores del coeficiente hemolítico «i» de α -aril-oxialquil-penicilinas.—4.3.4. Valores del coeficiente hemolítico «i» de isoxazoil-penicilinas.—4.3.5. Efecto de la adición de electrolito.—4.4. Influencia de los Polietilenglicoles (PEG) sobre la actividad hemolítica de las penicilinas semisintéticas.—4.4.1. Comportamiento de los eritrocitos en el sistema Agua-Polietilenglicol (PEG).—4.4.2. Comportamiento de los eritrocitos en el sistema disolución salina-Polietilenglicol (PEG).—4.4.3. Inhibición de la actividad hemolítica de α -aril-oxialquil-penicilinas por PEG-600 y PEG-1.540.—4.4.4. Inhibición de la actividad hemolítica de isoxazoil-penicilinas por PEG-1.540.—4.5. Influencia del Dimetil Sulfoxido (DMSO) sobre la actividad hemolítica de las penicilinas semisintéticas.—4.5.1. Comportamiento de los eritrocitos en el sistema Disolución salina-Dimetil Sulfoxido (DMSO).—4.5.2. Influencia del Dimetil Sulfoxido (DMSO) sobre la hemólisis inducida por Feneticilina K y Oxacilina Na.—4.5.3. Estudios espectrales.—4.6. Estudios cinéticos.—4.6.1. Cinética hemolítica.—4.6.2. Cinética de degradación.—V. DISCUSION.—VI. CONCLUSIONES.—VII. BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

I.—INTRODUCCION

1.1. Generalidades.

En condiciones normales, la hemoglobina permanece dentro de los glóbulos rojos y, debido al tamaño de sus moléculas y a las características especiales de la membrana, no difunde a través de ésta.

La ruptura de la membrana o la modificación en su estado físico determinan el paso de la hemoglobina al medio líquido en que se encuentran suspendidos los eritrocitos, BERG.¹

Si se diluye la sangre con agua destilada o con disoluciones hipotónicas, o si se suspenden los eritrocitos en esas disoluciones, el agua penetra dentro de los glóbulos rojos para restablecer el equilibrio osmótico entre las dos fases. Los glóbulos rojos aumentan de tamaño, tomando forma esférica y, si el paso de agua continúa, la presión de éstos llegará a un punto en que romperá la membrana. La hemoglobina liberada queda disuelta en el medio líquido, dando disoluciones rojas transparentes. El proceso, tan sencillo a simple vista, es en realidad algo más complicado. Es probable que la hemoglobina no esté contenida dentro de la célula simplemente como en una cavidad, ni incluso en cierto número de pequeños compartimientos, sino que se halle unida, en alguna forma, a la estructura celular.

Una razón para creerlo así es que los agentes puramente mecánicos no liberan el pigmento. La célula puede romperse y desmenuzarse, pero cada diminuta partícula retiene la parte correspondiente de hemoglobina.

En el presente trabajo se realiza un estudio de la actividad hemolítica de algunas penicilinas semisintéticas, pero sin olvidar la misma actividad ejercida por otros productos, también antibacterianos, que les precedieron en la lucha microbiana y que, si bien es cierto que no se emplean con profusión como bactericidas, no por eso dejan de ser utilizados, aunque sea de manera ocasional, como agentes preservadores en soluciones parenterales.

En el mecanismo de acción hemolítico, la membrana del glóbulo rojo juega un papel indispensable. Dicha membrana está constituida por proteínas y lípidos de diversas clases, en especial fosfolípidos, colesterol y, muy probablemente, pequeñas cantidades de cerebrósidos, a través de la cual realizan los correspondientes intercambios, LUCY.²

La membrana es impermeable a las sustancias de naturaleza coloidal, como las proteínas, y mantiene la separación entre las proteínas plasmáticas y la hemoglobina globular.

La membrana es permeable a las sustancias neutras, como el agua, la glucosa y la urea. Para las sustancias totalmente difusibles, la concen-

tración molar por litro en los glóbulos rojos es proporcionalmente menor que en el plasma; esas sustancias (glucosa, urea, etc.), tienen una concentración porcentual en los hematíes algo menor que en el plasma.

En el caso de iones inorgánicos, la membrana de los eritrocitos tiene un comportamiento particular, pues mientras es permeable para los aniones Cl^- , CO_3H^- , PO_4H^{2-} , que se difunden libremente, resulte de muy baja permeabilidad para los cationes Na^+ , K^+ , Ca^+ . El único catión que difunde libremente es el ión hidrógeno. La concentración de los aniones es diferente en los glóbulos rojos y en el plasma, a pesar de su libre difusión. Uno de los motivos es la diferente concentración de agua, como ocurre para las sustancias neutras.

Cuando en dos fases separadas por una membrana existen proteínas que, por su naturaleza coloidal, no difunden a través de ella, y que poseen grupos con cargas negativas, las condiciones de equilibrio de los aniones que son difusibles se encuentran determinadas por el equilibrio de membrana Donnan. Este equilibrio establece que la concentración de los aniones será menor en el lado de membrana que contenga mayor cantidad de grupos negativos no difusibles.

En el caso de los cationes Na^+ , K^+ , etc., la membrana del eritrocito se comporta de manera muy especial en su permeabilidad. Experiencias efectuadas con iones Na^+ y K^+ radiactivos han demostrado que éstos pueden penetrar, aunque lentamente, en la célula roja.

La difusión lenta de estos iones podría explicarse admitiendo la existencia en la membrana de poros con determinada carga, que facilitarían el paso de los aniones y que dificultarían el de los cationes, DEULEFEU.³

El objeto de la presente Memoria es hacer un estudio sobre la actividad hemolítica de las penicilinas semisintéticas correspondientes a la serie α -aril-oxialquil e isoxazolil-penicilinas, así como la determinación de sus correspondientes coeficientes isotónicos de excepcional importancia en la preparación de soluciones parenterales. Asimismo se ha estudiado la influencia de algunos solutos protectores (Polietilenglicoles 600 y 1.540, y Dimetil Sulfóxido) sobre la inhibición de la hemólisis eritrocítica producida por estos agentes antibacterianos.

II.—REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Agentes hemolíticos antibacterianos.

Si bien es cierto que son abundantes los estudios hemolíticos realizados con diversos agentes antibacterianos, no existen en la bibliografía estudios hemolíticos sobre penicilinas, ya sea aisladamente o con implicación de secuencia estructural.

2.1.1. Antibióticos y Sulfamidas.

Los estudios de carácter científico, revisados por nosotros, referentes a la acción hemolítica ocasionada por antibióticos, corresponden a los efectuados por NACHMAN y col.⁴ respecto a la anemia hemolítica producida por la estreptomycin. Los mecanismos principales que intervienen en la anemia hemolítica, producida por los medicamentos capaces de provocarla, los resumen los autores en dos grandes grupos:

1.º) Una deficiencia de carácter genético de la deshidrogenasa glucosa-6-fosfato de los eritrocitos, que les hace susceptibles a la acción hemolítica de determinados fármacos, generalmente inocuos.

2.º) La producción de un complejo medicamento-eritrocito, que estimula la formación de anticuerpos capaces de destruir los eritrocitos del paciente en presencia del fármaco.

El primero de ellos se observó por primera vez en las anemias inducidas por primaquina, mientras que la hemólisis derivada de la acción de un pseudohapteno, el «Stibophu», constituye el ejemplo inicial del segundo mecanismo hemolítico.

El caso de anemia hemolítica provocada por la estreptomycin, de que los autores hablan en su trabajo, parece constituir el primero de ellos, cuyo mecanismo íntimo no pudo ser esclarecido.

Otro antibiótico caracterizado por su acción hemolítica es el Cloramfenicol; desde hace tiempo se sabe que los medicamentos que contienen un anillo bencénico con un grupo nitro o amino, deprimen la función hematopoyética de la médula ósea.

El Cloramfenicol contiene el grupo nitrobenceno. No obstante, este antibiótico no causó discrasia hemática en perros que ingirieron 99 mg/kg/día durante dos años. Cuando se aumenta la dosis diaria a 253 mg/kg, entonces se altera la capacidad hematopoyética de la médula ósea en sentido desfavorable. En el hombre ha aparecido anemia aplásica después de la administración de Cloramfenicol durante 3 semanas.⁵

STRUMIA y RAYMOND⁶ informan acerca de una anemia hemolítica adquirida y su relación con la producción de anticuerpos antipenicilina.

BUSTINZA⁷ señala la acción hemolítica de la gramicidina. La escasez de información hemolítica debida a los antibióticos contrasta con la mayor abundancia de citas sobre la actividad hemolítica producida por otros agentes antibacterianos.

DE LA LOMA⁸ informa, en un estudio sobre anemias hemolíticas, que las sulfonamidas, tan empleadas en la clínica en el tratamiento de ciertas enfermedades, pueden originar una hemólisis tan intensa que, en algunos casos, llega a ser mortal.

2.1.2. Fenoles.

ANSEL y CADWALLADER⁹ han realizado un estudio completo de la actividad hemolítica de preservadores antibacterianos sobre eritrocitos humanos y de conejo, en presencia de CINA 0,85 % p/v.

Estos investigadores comienzan su estudio con los compuestos fenólicos que, como es sabido, resultan tóxicos para todo tipo de células.

A elevadas concentraciones, se sabe que precipitan las proteínas, mientras que bajas concentraciones de estos compuestos las desnaturalizan con coagulación. Este proceso de la desnaturalización puede no estar relacionado con el fenol, pero conduce a su penetración en los tejidos, GISVOL.¹⁰

La actividad hemolítica de los compuestos fenólicos, en orden creciente de actividad, fue: fenol, m-cresol, p-clorofenol y p-cloro-m-cresol. La hemólisis producida por estos compuestos probablemente resulte de la alteración de la membrana y/o penetración de los compuestos en el interior de la célula con la subsiguiente entrada de agua y la producción de la consiguiente hemólisis.

Es interesante señalar que los cresoles son, aproximadamente, dos veces más hemolíticos que el fenol, y que los p-cloro derivados de m-cresol y fenol son cada uno, aproximadamente, dos veces más hemolíticos que los compuestos de origen.

Se ha podido comprobar una relación directa entre las actividades antibacteriana y hemolítica de los compuestos estudiados.

En estudios relativamente recientes, JOSWICK y GERHARDT¹¹ informan que los agentes antibacterianos fenólicos ejercen acción letal por alteración física de la membrana celular de las bacterias o por alteración de los mecanismos que controlan la permeabilidad de la membrana celular.

2.1.3. Alcoholes.

La actividad hemolítica de los alcoholes, en orden creciente de efectividad, estudiada por los mismos autores¹¹ fue: Alcohol bencílico, alcohol fenil etílico, cloro-butanol y alcohol p-cloro-fenil etílico. Como en el caso de los compuestos fenólicos, las moléculas cloradas han sido encontradas como más hemolíticas.

LACHMAN y col.¹² informan sobre la actividad antibacteriana de algunos preservadores alcohólicos, señalando que los compuestos clorados son más activos que los no clorados. La mejor actividad de los clorados fue atribuida a la capacidad inherente de las moléculas halogenadas para dispersarse más rápidamente en los disolventes no polares y atravesar, de esta forma, la barrera lipídica de la bacteria sin dificultad, pudiendo aplicarse este mismo razonamiento para su actividad sobre el glóbulo rojo.

2.1.4. *Tensoactivos catiónicos.*

Los eritrocitos son altamente sensibles al cloruro de benzalconio, al cloruro de benzatonio y, en general, a otros tensoactivos catiónicos. Los efectos ejercidos sobre los eritrocitos humanos y de conejo por detergentes iónicos han sido atribuidos al descenso de la tensión interfacial y al complejo colesterol-fosfolípido-lipoproteína de la membrana, pudiendo pensar que el principal punto de ataque sea la monocapa de colesterol, según los estudios realizados por PETHICA.¹³

Los agentes catiónicos examinados por los investigadores⁹ fueron, aproximadamente, 300 veces más activos que los que producen solamente trazas de hemólisis y unas 200 veces más activos que los que producen hemólisis total, como el fenol. Los coeficientes de fenol dados para el cloruro de benzalconio a 37°C, por LAWRENCE,¹⁴ están comprendidos entre 293 y 407.

2.1.5. *Mercuriales.*

Otros agentes preservadores estudiados, que causan hemólisis en eritrocitos humanos y de conejo, a concentraciones relativamente bajas, han sido los mercuriales. Trazas de hemólisis en eritrocitos de conejo se detectan en disoluciones salinas 0,85 % p/v, que contienen 0,04 % de timerosal, observándose una hemólisis total a una concentración 10 veces mayor.⁹ Cuando los eritrocitos tratados fueron humanos, las trazas de hemólisis se observaron en disoluciones al 1,5 % de timerosal, siendo la hemólisis total en disoluciones al 2 %. Aunque no hay evidencia macroscópica de la desnaturalización de las proteínas en el estudio efectuado con los mercuriales, el empleo del microscopio electrónico por SAITO¹⁵ ha demostrado que el mercurio puede producir cambios en la membrana de los glóbulos rojos humanos en forma de pliegues, granulaciones y, a veces, coagulación. En otros compuestos fenilmercúricos y mersalyl, BENESCH y col.¹⁶ encuentran que son agentes hemolíticos debidos a interacción de mercuriales orgánicos con grupos sulfidrilo de la célula, que a su vez son esenciales para el mantenimiento de la estructura intacta del eritrocito. La interacción de mercurio y grupos sulfidrilo es la base para la explicación del mecanismo de acción de los mercuriales, según BREWER.¹⁷

2.1.6. *Parabenos y formaldehído sulfoxilato sódico.*

Estos compuestos han sido estudiados por GOTTFRIED.¹⁸ Las disoluciones empleadas contenían concentraciones incluso superiores a la máxima solubilidad de cada paraben. No se encontró hemólisis para las disoluciones de paraben, excepto para una, saturada de butilparaben, en la que se encontró que un 12 % de los eritrocitos del conejo eran lisados por el

preservador, en tanto que este valor se rebajaba al 6 % cuando los eritrocitos fueron humanos.

El formaldehído sulfoxilato sódico, en cantidades normalmente empleadas por vía parenteral (0,1 %), no tiene efectos hemolíticos sobre los glóbulos rojos humanos o de conejo. En concentraciones del 1 % los eritrocitos toman color oscuro pero permanecen sin hemolizar, y en disoluciones del 5 % los autores han encontrado que se produce una fuerte hemólisis con liberación de un exudado rojo oscuro.

2.1.7. *Cloruros de alquil-dimetil-bencil-amonio.*

La actividad hemolítica de varios cloruros de alquil-dimetil-bencil-amonio sobre la sangre de conejo ha sido determinada por CADWALLADER y ANSEL.¹⁹ La actividad hemolítica aumenta con el incremento de la longitud de la cadena alquílica desde C₈-C₁₈. Con la excepción de los homólogos tetradecílicos, la actividad hemolítica de las sales de amonio cuaternarias que tienen el mismo grupo alquilo aumenta con la cloro-sustitución en el grupo bencilo.

Se cree, generalmente, que los agentes tensoactivos son bactericidas más bien que bacteriostáticos, NEWTON.²⁰ Los germicidas de amonio cuaternario han sido extensamente estudiados por GLASSMAN,²¹ respecto a su acción letal contra los microorganismos, y la acción letal de este grupo de germicidas se atribuye a su actividad superficial y a la habilidad para fijarse en lugares cargados negativamente. GILLY y FEW²² encuentran que los fosfolípidos de las membranas celulares son los puntos de «binding» o unión para los compuestos de amonio cuaternario. HOTCHKISS²³ admite que la acción letal de los germicidas de amonio cuaternario está en razón directa de su acción superficial y de su permeabilidad, habiendo demostrado que cuando son lisadas las células bacterianas por agentes tensoactivos, exudan del citoplasma varias sustancias intracelulares.

La hemólisis de los eritrocitos humanos por detergentes iónicos ha sido atribuida a un descenso de la tensión superficial y colapso del complejo colesterol-fosfolípido-lipoproteína de la membrana, siendo la monocapa de colesterol el principal punto de ataque; es decir, el mecanismo es el mismo que el señalado en el apartado de Tensoactivos catiónicos.

Aunque los germicidas de amonio cuaternario no están incluidos en los estudios de BURNET y LUSH,²⁴ estos autores han encontrado una estrecha relación entre las concentraciones de desoxicolato sódico y saponina, capaz de hemolizar los hematíes del conejo y destruir el virus de la herpes. Este género de correlaciones entre las actividades antimicrobianas y las actividades hemolíticas ha sido encontrado en las sales del amonio cuaternarias, por lo que la actividad hemolítica de las sales de amonio cuaternarias puede ser una indicación de su actividad bacteriolítica.

2.2. Soluciones isotónicas.

El método hemolítico para el estudio de la permeabilidad de los glóbulos rojos fue introducido por HAMBURGER en 1883²⁵ y empleado también por GRIJNS²⁶ y otros investigadores cuyos trabajos han sido revisados por DAVSON²⁷ y PONDER.²⁸

ANSEL y HUSA,²⁹ empleando sales del ácido glucónico, hacen un estudio comparativo de los valores de «i», calculados por el método hemolítico, con los obtenidos por el descenso del punto de congelación. Los valores hemolíticos de «i» resultaron ser mayores cuando emplearon el método hemolítico, y entre las diversas sales utilizadas, fue el gluconato de zinc el que proporcionó valores de «i» más elevados. debido a la precipitación parcial de la hemoglobina liberada de los eritrocitos lacados.

ZANOWIAK y HUSA³⁰ emplean los datos obtenidos en el estudio hemolítico para calcular los valores «i» de Van't Hoff para alcoholes monohídricos y polihídricos, encontrando que todos los que tienen un peso molecular menor que el eritrol, causan hemólisis completa a concentraciones calculadas para ser isosmóticas; sin embargo, los dioles y trioles de bajo peso molecular investigados no causan hemólisis en presencia de CNa 0,6 % p/v.

El método hemolítico ha sido empleado por THOMASSON y HUSA³¹ para la determinación del coeficiente isotómico «i» de varias sales de alcaloides. Los datos aportados por estos autores son de estimado valor para la preparación de disoluciones isotónicas con la sangre, puesto que los métodos basados sobre datos físico-químicos no son siempre ciertos. Empleando el método hemolítico, determinaron valores «i» de Van't Hoff para diversas sales de ácidos orgánicos. Los resultados indican que las sales de sodio y de potasio de los ácidos cítrico, tartárico y succínico tiene valores «i» hemolíticos más elevados de lo que pudiera esperarse. El acetato, salicilato y benzoato de amonio, así como el tartrato de bismuto y potasio, causan el 100 % de hemólisis a todas las concentraciones ensayadas; lo que evidencia la necesidad de reconsiderar el uso de los coeficientes isotónicos obtenidos, teniendo en cuenta solamente las propiedades coligativas.

2.3. Polietilenglicoles.

Son numerosas las comunicaciones aparecidas en los últimos años, relacionadas con la inactivación de varios preservadores antibacterianos cuando, en su presencia, se emplearon productos tales como gomas vegetales y tensoactivos no iónicos. PISANO.³² En este sentido. ANSEL.³³ estudia la influencia de los polietilenglicoles (PEG) sobre la respuesta de los eritrocitos del conejo a concentraciones hemolíticas de fenol, m-cresol y

p-clorofenol. Los resultados obtenidos le permiten afirmar que, por razón de las interacciones entre cada uno de los agentes antibacterianos y los polietilenglicoles, éstos son capaces de prevenir la hemólisis. Este investigador encuentra también que los polímeros de elevado peso molecular son más efectivos que los de grado de polimerización más bajo.

GLAUSER y TALBOT³⁴ describen el uso de polímeros de gran tamaño molecular, encontrando que estos compuestos son efectivos en la protección celular y que, a diferencia del glicerol, no necesitan penetrar en la célula para cumplir esta propiedad.

SLOVITER³⁵ investigó con polímeros de etilenglicol. de peso molecular 500-1.500. e indicó que la mejor efectividad la proporcionan a una concentración del 25 % p/v.

2.4. Dimetil Sulfóxido.

La influencia del Dimetil Sulfóxido (DMSO) sobre la actividad hemolítica de varias clases de preservadores antibacterianos ha sido investigada «in vitro» por ANSEL y LEAKE,³⁶ empleando eritrocitos de conejo. Los autores informan que el DMSO. a concentraciones de aproximadamente 20 %, rebaja de manera notoria la respuesta hemolítica de los glóbulos rojos de conejo, «in vitro», frente al fenol. Posteriormente, se han ampliado los estudios con Dimetil Sulfóxido para ver si su conducta o comportamiento ante el fenol es peculiar de este par de compuestos o si puede hacerse extensiva a otros compuestos antibacterianos.

Cuando el Dimetil Sulfóxido se emplea en concentraciones superiores al 20 %, entonces ofrece un marcado poder hemolítico.

Se conoce poco acerca de la toxicidad del Dimetil Sulfóxido y, aunque en un reciente informe, RUBIN y MATTIS³⁷ describen cambios reversibles en el cristalino de perros que recibieron una dosis oral de 2,5 g/Kg/día, lo cierto es que este nivel es alto y concede bastante margen para su empleo, aparte de su excelente absorción por el tubo digestivo.

ASHWOOD-SMITH³⁸ informan que es menos tóxico que el glicerol. HUGGINS³⁹ lo estimó técnicamente satisfactorio para la conservación de las células rojas. PYLE y BOYER⁴⁰ encuentran que el Dimetil Sulfóxido es hemolítico para los eritrocitos humanos a la concentración del 40 % p/v.

CAPITULO II

III.—PARTE EXPERIMENTAL.

3.1. *Material y métodos.*

3.1.1. *Animales.*

Para el desarrollo de nuestros experimentos hemos empleado como donadores de sangre, el conejo común y el conejo blanco de Nueva Zelanda; el primero, procedente de la Cátedra de Genética y Alimentación de la Facultad de Veterinaria de León, y el segundo, procedente de los Laboratorios «Wildelot», TILBURG (Holanda), con certificado de origen, facilitado por Antibióticos, S. A. (León).

3.2. *Compuestos utilizados. Preparación y pureza.*

3.2.1. α -aril-oxialquil-penicilinas.

Fenoximetilpenicilina (sal potásica). El producto empleado ha sido el comercial de Antibióticos, S. A., con una pureza media del 99,3 % contrastada por métodos químicos y biológicos.

dl- α -fenoxietil-penicilina (sal potásica). El producto ensayado provenía de muestras comerciales de Antibióticos, S. A., y posee una pureza media del 99,4 % contrastada por valoración química y biológica.

dl- α -fenoxietil-penicilina (sal sódica). Se preparó a partir de la disolución acuosa de la correspondiente sal potásica por extracción a pH 1,8 con metil-isobutil-cetona y subsiguiente precipitación con 2-etil-hexato sódico. El producto obtenido, valorado biológicamente, es del 99,1 % de pureza.

Obtención de los diastereoisómeros de la dl- α -fenoxietil-penicilina.

d- α -ácido fenoxipropiónico. El método empleado para la preparación de este isómero óptico ha sido el de FOURNEAU y SANDULESCU.⁴¹ Partiendo de 31,2 gramos de clorhidrato de yohimbina y de dl- α -ácido fenoxipropiónico, se obtienen 12 gramos de d- α -ácido fenoxipropiónico ópticamente puro. Punto de fusión 86-88°C. $[\alpha]_D^{20} = +39,8^\circ$ (c = 1 % en alcohol absoluto) frente a $[\alpha]_D^{20} = +39,3^\circ$ dado por la literatura.⁴¹

dl- α -fenoxietil-penicilina potásica y l- α -fenoxietil-penicilina potásica.—La preparación de estas sales se lleva a cabo de la misma forma que describen PERRON y col.⁴³ Las rotaciones ópticas encontradas han sido $[\alpha]_D^{20} = +250^\circ$ y $[\alpha]_D^{20} = +217^\circ$, respectivamente (c = 1 % en agua).

l- α -fenoxipropil-penicilina (sal potásica).—El producto empleado ha sido el denominado por Pfizer, Cillinex. El método seguido en la liberación de excipientes estabilizantes consiste en la disolución en agua del producto, seguido de una extracción a fase orgánica, a pH 1,8 y posterior precipitación con 2-etil-hexato potásico. La pureza del producto obtenido ha sido del 98,7 %, por valoración biológica.

3.2.2. *Isoxazoil-Penicilinas.*

3-fenil-5-metil-4-isoxazoil-penicilina (sal sódica).—El producto empleado ha sido el comercial puro de Antibióticos, S. A., libre de excipientes, y de pureza media del 99,3 %, determinada por procedimiento químico y biológico.

3-o-clorofenil-5-metil-4-isoxazoil-penicilina (sal sódica monohidrato).—El producto ensayado por nosotros provenía del preparado comercial Orbenin (Beecham), libre de aditivos y de pureza 99,0 %, contrastada biológicamente.

2,6-o-dicloro-fenil-5-metil-4-isoxazoil-penicilina (sal sódica monohidratada).—Ha sido empleado el producto comercial puro de Antibióticos, S. A., de una pureza media, química y biológica, del 99,2 %.

Al objeto de relacionar, de forma simplificada, las estructuras de la cadena lateral de estas penicilinas con los nombres químicos, genéricos y comerciales de uso más frecuente, hemos creído conveniente la confección de la Tabla I.

3.2.3. *Polietilenglicoles 600 y 1.540.*

Los empleados en este trabajo han sido de grado comercial pertenecientes a la firma Schuchardt, München.

3.2.4. *Dimetil Sulfóxido.*




Se ha empleado el de grado reactivo, obtenido comercialmente en la casa E. Merck, A. G., Darmstadt.

3.2.5. *Cloruro sódico.*




Se usó cloruro sódico de grado purísimo, de la casa Panreac. Solubilidad a 20°C, 35,8 %.

TABLA I

Penicilinas ácido-resistentes pero susceptibles de destruir la penicilinasasa.

R-6APA	Químico	Genérico	Comercial
 PM = 350,5	α -fenoximetil penicilina K	Penicilina V-K	Compocillin (Abbot) V-Cillin (Lilly) Pen-Vee (Wyeth)
 PM = 402,5	dl- α -fenoxietil penicilina K	Feneticilina K	Bendralán (Antib. S. A.) Sincillin (Bristol) Alpen (Schering) Chemipen (Squibb) Maxipen (Roering)
 PM = 416,5	1- α -fenoxipropil penicilina K	Propicilina K	Brocillin (Beecham) Ultrapen (Harvey) Cillinex (Pfizer)

Penicilinas resistentes a los ácidos y a la penicilinasasa

R-6APA	Químico	Genérico	Comercial
 PM = 441,5	5-metil-3-fenil-4- isoxazoil penicilina Na	Oxacilina Na	Prostaphlin (Bristol) Resistopen (Squibb)
 PM = 457,9	3-0-clorofenil-5- metil-4-isoxazoil penicilina Na	Cloxacilina Na	Orbenin (Beecham) Tegopen (Bristol)
 PM = 492,3	3-0-clorofenil-5- metil-4-isoxazoil penicilina Na	2,6- Dicloxacilina Na	Dynapen (Beecham) Veracillin (Roering)

R = radical unido al núcleo fundamental de las penicilinas (ácido 6-amino-penicilánico o 6APA).

En lo sucesivo haremos siempre referencia a la correspondiente penicilina por su nombre genérico.

3.3. Aparatos.

pH-metro Beckman, modelo Zeromatic.

Centrífuga M. S. E., modelo Angle-50.

Colorímetro Bausch-Lomb, de red de difracción, modelo Spectronic-20.

Balanza de precisión Sartorius, modelo 2.662.

Termostato Memmert $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Estufa Memmert de control automático de temperatura.

Espectrofotómetro U.V. Beckman, modelo DK-2.

Elementos de medida:

Microbureta Afora, de 5 ml contrastada por pesada.

Pipetas Silberbrand graduadas c/franja de 0,1 ml en 1/1.000.

Pipetas Silberbrand graduadas c/franja de 1 ml en 1/100.

Pipetas Silberbrand de 10 ml graduadas c/franja en 1/10.

3.4. Métodos.

3.4.1. Preparación de las disoluciones.

Las distintas disoluciones de cada antibiótico en ClNa 0,093 M fueron preparadas sobre la base % p/v. Cuando se trabajó con Polietilenglicoles (PEG), las disoluciones acuosas o salinas de los mismos se prepararon en % p/v de polímero. Las disoluciones de Dimetil Sulfoxido (DMSO) se prepararon sobre la base v/v, tanto en agua como en disolución salina 0,093 M.

3.4.2. Recogida de sangre.

La sangre utilizada en la parte experimental correspondiente a la actividad hemolítica de las penicilinas semisintéticas ha sido la de conejo común y la de conejo blanco de Nueva Zelanda; sin embargo, en la parte experimental restante, la sangre utilizada ha sido, exclusivamente, de conejo blanco de Nueva Zelanda.

La sangre se obtuvo por punción cardíaca, empleando jeringuilla de vidrio de 10 c.c. y aguja hipodérmica de 0,9 mm. de diámetro, y 40 mm. de longitud. Una vez extraída, la sangre fue inmediatamente desfibrinada por un suave movimiento rotatorio en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, que contenía perlas de vidrio. Generalmente, es suficiente un período de 5 a 10 minutos para la desfibrinación y arteriolización de la sangre por aireación.

Aunque cada experimento hemolítico se ha realizado con sangre fresca, en los experimentos llevados a cabo con sangre almacenada, a la temperatura del refrigerador ($+4^\circ\text{C}$) durante 72 horas, no hemos encontrado diferencias significativas.

3.4.3. *Comprobación de la Ley de Lambert Beer.*

Al objeto de contrastar la técnica experimental y determinar el volumen de sangre óptimo a emplear en las condiciones experimentales, se han hallado las absorbancias a distintos volúmenes de sangre, en el intervalo de 0,01 ml a 0,1 ml, en agua destilada (hemólisis total). La representación gráfica de las densidades ópticas o absorbancias (E), en función de los volúmenes de sangre empleados, nos da una línea recta en todo el intervalo que cumple satisfactoriamente la Ley de Beer, como puede verse en la gráfica (1). Las lecturas de las absorbancias se han realizado a la longitud de onda de 540 mμ. máximo más característico de la oxihemoglobina en el espectro visible.⁴⁴ De los volúmenes de sangre empleados fácilmente se deduce, de la representación gráfica, que 0,05 ml es el volumen óptimo a emplear, puesto que cubre perfectamente la escala de absorbancias desde el valor de cero a uno, entre cuyos valores se puede realizar cualquier lectura intermedia y, por otra parte, al corresponder el valor 1 de absorbancia a la hemólisis total para 0,05 ml, el cálculo resulta extraordinariamente cómodo.

3.4.4. *Determinación cuantitativa del grado de hemólisis.*

El método seguido para la determinación del grado de hemólisis de los eritrocitos en las diversas disoluciones de trabajo, fue esencialmente el descrito por HUNTER.⁴⁵ Está basado en el hecho de que la oxihemoglobina liberada por una disolución hipotónica es una función directa del número de células hemolizadas. Por otra parte, como del lacado de los eritrocitos resulta una hemólisis completa, cuando éstos están presentes en una disolución de carbonato sódico 0,1 %, es posible expresar la hemólisis que tiene lugar a una concentración dada de sal, en función de la hemólisis total. Una determinación cuantitativa de la hemólisis parcial presentada a cualquier concentración de sal en la disolución, se puede llevar a cabo fácilmente centrifugando y despreciando las células no hemolizadas y determinando la oxihemoglobina liberada en el líquido sobrenadante por medio de un colorímetro fotoeléctrico, leyendo en la longitud de onda 540 mμ.

El método consiste en colocar 10 ml de la disolución problema, por duplicado, en sendos tubos de ensayo; con una pipeta Silberbrand se adicionan 0,05 ml de sangre desfibrinada y aireada se taponan los tubos y se invierten varias veces para lograr una homogeneidad completa. Las mezclas disolución problema-sangre se trasladan a un baño a 37°C ± 0,5 durante 45 minutos. Al final de este período, se centrifugan las mezclas a 2.000-2.500 r.p.m. durante 5 minutos, se recoge el líquido sobrenadante, se deposita en tubos colorimétricos para efectuar la lectura de absorbancia

de luz a longitud de onda de 540 mμ. empleando un colorímetro Spectronic-20.

Con anterioridad a la lectura de la absorbancia de la disolución problema se preparó un blanco de la misma, que permaneció en el baño a 37°C durante 45 minutos antes de proceder a su centrifugación para recogida del sobrenadante, el cual, depositado en un tubo colorimétrico, se lleva la absorbancia al valor cero, quedando así ajustado el colorímetro para las lecturas de absorbancia de las disoluciones problema. Mediante la absorbancia de cualquier disolución con 0,05 ml de sangre, se relaciona con la producida por 0,05 ml de sangre adicionados a 10 ml de carbonato sódico a 10 ml de agua destilada; en ambos casos la lectura obtenida corresponde al 100 % de hemólisis. Para cada muestra se hicieron de 6 a 10 lecturas en tubos diferentes. El cálculo del porcentaje de hemólisis se hace dividiendo el valor medio de la lectura de la absorbancia de la disolución problema por la absorbancia correspondiente a la disolución de carbonato sódico a 0,1 % o agua destilada más sangre; este cociente multiplicado por 100 representa el 1 % de hemólisis total de la disolución.

Este cálculo se resume en la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Lectura absorbancia disolución problema}}{\text{Lectura absorbancia CO}_3\text{Na}_2 \text{ o agua dest.}} \times 100$$

Al adoptar el procedimiento de cálculo señalado se tuvo en cuenta, en el caso de las disoluciones salinas, cualquier absorbancia de luz inherente a la opalescencia o a la bilirrubina. Para ello, se preparó un blanco colocando 0,05 ml de sangre en 10 ml de ClNa 0,6 % p/v, que recibió el mismo tratamiento que las disoluciones problema; leídas las absorbancias, se obtuvieron valores de 0,01 y 0,03, que corresponden a unos valores de hemólisis del 1 y del 3 %, respectivamente, por lo que en la práctica no es necesario efectuar ninguna sustracción en los valores hallados en la lectura de las absorbancias proporcionadas por las disoluciones problema.

CAPITULO III

IV.—RESULTADOS

4.1. *Hemólisis producida por α-aril-oxialquil e isoxazoil penicilinas.*

Los grados de hemólisis encontrados para los tres primeros términos de las dos series de penicilinas estudiadas, en función de las concentraciones de las mismas, vienen recogidas en las Tablas II a VII. En las gráficas 2, 3 y 4 se representan los tantos por ciento de hemólisis frente a los valo-

res de las concentraciones de penicilina presentes en la disolución 0,093 M de ClNa.

Las condiciones experimentales han sido siempre las mismas, es decir, un tiempo de incubación de 45 minutos y 37°C. La sangre empleada procedía de los tipos de donadores utilizados. Las dispersiones máximas de los resultados obtenidos fueron del orden del 10 % cuando se empleó el conejo común como donador, disminuyendo este valor al 7 % cuando el donador fue el conejo blanco de Nueva Zelanda. En ambos casos, el número de lecturas efectuadas con distintos donadores, en diferentes tubos, ha sido un mínimo de 8 y un máximo de 10.

TABLA II

Donador: conejo común. Temperatura = 37°C
Tiempo incubación = 45 min.

Penicil V-K g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,75	1,00	100	—	5,8	6,8
3,00	0,81	81	± 0,032	6,0	6,8
2,50	0,57	57	± 0,034	6,0	6,8
2,00	0,34	34	± 0,025	6,1	6,9
1,50	0,17	17	± 0,022	6,0	6,8
1,00	0,08	8	± 0,021	6,1	6,9

Donador: conejo blanco de Nueva Zelanda. Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Penicil V-K g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,75	1,00	100	—	5,7	6,8
3,00	0,79	79	± 0,031	5,9	6,8
2,50	0,51	51	± 0,025	5,8	6,9
2,00	0,32	32	± 0,023	6,0	6,9
1,50	0,20	20	± 0,023	6,1	7,0
1,00	0,12	12	± 0,017	6,1	6,9

a = valores medios de 10 lecturas.
= desviación tipo o cuadrática media = $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$

TABLA III

Donador: conejo común. Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Feneticilina K g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,90	0,98	98	± 0,020	5,7	6,8
3,00	0,71	71	± 0,023	5,7	6,8
2,50	0,43	43	± 0,023	5,8	6,9
2,00	0,22	22	± 0,036	5,9	6,8
1,50	0,11	11	± 0,025	6,0	6,8
1,00	0,04	4	± 0,020	6,0	6,9

Donador: conejo blanco de Nueva Zelanda. Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Feneticilina K g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,90	0,99	99	± 0,007	5,8	6,9
3,00	0,73	73	± 0,023	5,7	6,9
2,50	0,41	41	± 0,025	5,9	7,0
2,00	0,20	20	± 0,039	5,8	6,9
1,50	0,08	8	± 0,018	6,0	6,9
1,00	0,02	2	± 0,020	5,9	6,9

a = valores medios de 10 lecturas.

TABLA IV

Donador: conejo común.

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Propicilina K g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,95	0,97	97	± 0,023	5,7	6,8
3,00	0,66	66	± 0,031	5,7	6,9
2,50	0,43	43	± 0,020	5,8	6,8
2,00	0,24	24	± 0,035	6,0	6,9
1,50	0,13	13	± 0,023	6,0	6,9
1,00	0,05	5	± 0,023	6,1	7,0

Donador: conejo blanco de
Nueva Zelanda.Tiempo incubación = 45 min.
Temperatura = 37°C.

Propicilina K g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,95	1,00	100	—	5,6	6,9
3,00	0,68	68	± 0,025	5,8	7,0
2,50	0,36	36	± 0,031	5,7	7,0
2,00	0,19	19	± 0,018	5,8	6,9
1,50	0,09	9	± 0,019	6,0	7,1
1,00	0,03	3	± 0,017	5,8	7,0

a = valores medios de 8 lecturas.

TABLA V

Donador: conejo común.

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Oxacilina Na g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,00	0,98	98	± 0,022	5,5	6,8
2,00	0,66	66	± 0,032	5,6	6,9
1,75	0,48	48	± 0,030	5,5	6,8
1,50	0,24	24	± 0,028	5,7	6,9
1,00	0,09	9	± 0,019	5,8	6,8
0,50	0,04	4	± 0,021	5,7	6,9

Donador: conejo blanco de
Nueva Zelanda.Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Oxacilina Na g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
3,00	1,00	100	—	5,6	6,9
2,00	0,61	61	± 0,020	5,8	6,9
1,75	0,43	43	± 0,023	5,8	7,0
1,50	0,21	21	± 0,021	5,7	7,1
1,00	0,04	4	± 0,020	5,8	7,0
0,50	0,01	1	± 0,010	5,7	6,9

a = valores medios de 10 lecturas.

TABLA VI

Donador: conejo común.

Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Cloxacil. Na g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
2,15	0,98	98	± 0,021	5,7	6,8
2,00	0,90	90	± 0,045	5,8	6,9
1,50	0,55	55	± 0,034	6,0	6,8
1,00	0,21	21	± 0,029	5,9	6,9
0,50	0,06	6	± 0,015	6,0	6,8
0,25	0,02	2	± 0,022	5,9	6,9

Donador: conejo blanco de
Nueva Zelanda.Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Cloxacil. Na g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
2,15	1,00	100	—	5,6	6,8
2,00	0,88	88	± 0,023	5,8	7,1
1,50	0,47	47	± 0,030	5,8	7,0
1,00	0,48	18	± 0,021	5,7	6,9
0,50	0,04	4	± 0,020	6,0	7,0
0,25	—	—	—	—	—

a = valores medios de 9 lecturas.

TABLA VII

Donador: conejo común.

Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

2,6 Dicloxaci- lina Na g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
1,25	1,00	100	—	5,9	7,0
1,00	0,97	97	± 0,020	6,0	6,9
0,75	0,70	70	± 0,038	6,1	6,9
0,50	0,36	36	± 0,015	6,0	7,0
0,25	0,13	13	± 0,019	6,2	7,1
0,10	0,02	2	± 0,020	6,2	7,1

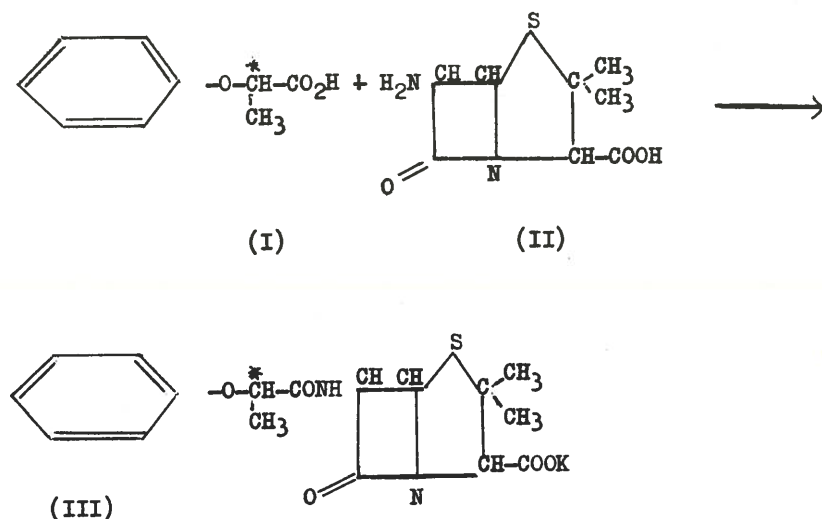
Donador: conejo blanco de
Nueva Zelanda.Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

2,6 Dicloxaci- lina Na g/100 ml	Absorbancia (E) ^a	% Hemólisis		pH inicial	pH final
1,25	1,00	100	—	5,8	6,9
1,00	0,90	90	± 0,028	5,9	6,9
0,75	0,62	62	± 0,020	6,1	7,0
0,50	0,28	28	± 0,021	6,0	6,9
0,25	0,08	8	± 0,014	6,1	7,2
0,10	0,01	1	± 0,010	6,2	7,0

a = valores medios de 10 lecturas.

4.1.1. Actividad hemolítica de los Diastereoisómeros de la Feneticilina Potásica.

La Feneticilina se prepara por N-acilación del ácido 6-aminopenicilánico (II) con el ácido dl- α -fenoxipropiónico (I), dando como producto de reacción la sal potásica (III).



Debido a la presencia de un carbono asimétrico en la cadena lateral de la molécula (*), el compuesto (III) existe como la mezcla de dos formas diastereoisómeras de distintas propiedades físicas y antimicrobianas. Bajo determinadas condiciones, GOUREVITCH y col.⁴⁶ han demostrado que la actividad de la d- α -fenoxietil-penicilina es, en muchos casos, sensiblemente menor que la l- α -fenoxietil-penicilina. Esta dependencia estructural química/actividad antimicrobiana de los diastereoisómeros de la Feneticilina induce a pensar que pueden existir diferencias en su comportamiento hemolítico. La Tabla VIII recoge los valores encontrados para los diastereoisómeros en las condiciones experimentales indicadas. En las gráficas 5a y 5b se representan los porcentajes de hemólisis frente a las concentraciones de cada isómero óptico en ClNa 0,093 M. Debido a que la variable fragilidad eritrocítica ha sido observada en los experimentos llevados a cabo con la Feneticilina K, en los experimentos realizados con los diastereoisómeros hemos utilizado sangre de conejo blanco de Nueva Zelanda, a causa de su mejor reproductividad y menor dispersión de los resultados obtenidos.

TABLA VIII

Donador: conejo blanco de Nueva Zelanda.

Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Concentración d- α -fenoxietil penicilina Ka	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
3,5	0,93	93	5,8	6,9
3,0	0,75	75	5,7	6,8
2,5	0,43	43	5,8	7,0
2,0	0,22	22	6,1	6,9
1,5	0,09	9	6,0	6,9

Donador: conejo blanco de Nuva Zelanda.

Temperatura = 37°C.
Tiempo incubación = 45 min.

Concentración l- α -fenoxietil penicilina Ka	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
3,5	0,88	88	5,8	7,0
3,0	0,70	70	5,9	6,9
2,5	0,38	38	5,9	7,0
2,0	0,17	17	6,0	7,1
1,5	0,05	5	6,0	7,1

a = nombre químico de cada diastereoisómero.

4.1.2. Influencia de la concentración de sangre.

A las concentraciones molares de las correspondientes penicilinas, en su forma salina, que causan hemólisis total, se les añade distintas cantidades de sangre de conejo, midiendo el grado de hemólisis para cada adición de sangre. La variación del grado de hemólisis con la cantidad de sangre añadida se recoge en el cuadro siguiente:

Antibiótico	Concentración en mol $1^{-1} \cdot 10^{-2}$ (a)	ml de sangre añadidos a la disolución de penicilina:			
		0,04	0,06	0,08	0,10
Penicilina V-K	9,6	100	85	38	18
Feneticilina K	9,8	100	78	36	16
Propicilina K	9,5	100	86	29	16
Oxacilina Na	7,8	100	88	40	20
Cloxacilina Na	4,7	100	84	41	19
2.6-Dicloxacilina Na	2,5				

(a) en presencia de ClNa 0,093 M.

4.2. Efecto de pH de las disoluciones sobre la presión osmótica intracelular.

En todos los experimentos llevados a cabo, se ha tenido especial cuidado con los pH de las disoluciones a estudiar. A valores de pH fisiológico, las cargas negativas son las que prevalecen en la hemoglobina de los glóbulos rojos, y aproximadamente, se requieren 50 meq/l de cationes para la neutralidad eléctrica. Como la hemoglobina es un anfolito, sus cargas negativas disminuyen cuando el medio tiene carácter ácido, liberando cationes, los cuales son incapaces de difundir al fluido extracelular a través de la membrana de la célula por no ser ésta permeable para ellos y atrayendo, por tanto, aniones desde el líquido extracelular. Una disminución del pH, por consiguiente, incluye una elevación de la presión osmótica intracelular y, por el contrario, un aumento del pH origina una caída de la presión osmótica intracelular. La concentración isotónica debe, pues, depender de alguna manera, del pH de la disolución. SETNIKAR I. y TEMELCOU O.⁴⁷ ofrecen la prueba experimental de esta hipótesis. Aunque la concentración de cationes, en la disolución objeto de su examen, se mantuvo constante 155 meq/l de Na⁺), observaron que el volumen celular aumenta en las disoluciones ácidas y disminuye en las alcalinas, demostrando este hecho que la presión osmótica de los glóbulos rojos aumenta en contacto con disoluciones ácidas y disminuye cuando las disoluciones tienen carácter básico.

Este hecho actual desautoriza a MAIZELS⁴⁸ y a RAPOPORT,⁴⁹ quienes por estas fechas habían indicado que un pH ácido disminuía la hemólisis, si bien es cierto que su afirmación está relacionada con el empleo de solutos para la conservación de la sangre. MAIZELS y WHITTAKER,⁵⁰ buscando diluyentes para conservar la sangre, indicaron el pH 6,6 como el más idóneo para proporcionar una buena conservación. Quizás este valor de pH pudiera ser el límite inferior tolerable para la protección del glóbulo rojo. PLOUVIER,⁵¹ estudiando la resistencia de los glóbulos rojos, considera que ésta está en razón directa con las variaciones del pH del medio.

4.3. Coeficiente de Van't HOFF.

Aunque el método hemolítico ha sido extensamente empleado en los estudios de permeabilidad celular, pocas aplicaciones del mismo han sido llevadas a cabo en el estudio y preparación de las disoluciones isotónicas. WOKES⁵² determinó la relación concentración isotónica/concentración hemolítica para un gran número de sustancias inorgánicas y comprobó que conociendo esta relación es posible estimar la concentración isotónica de una disolución desconocida por dilución de esta última hasta que, justamente, produjese hemólisis, concluyendo que si una disolución diluida con la mitad de su volumen de agua destilada produce hemólisis, no es isotónica.

HUSA y ADAMS⁵³ han empleado una técnica más rígida que la dada por WOKES⁵² y han demostrado que la hemólisis de los glóbulos rojos no es prevenida por ciertas sustancias calculadas para ser isotónicas con la sangre, de acuerdo con los métodos basados sobre propiedades coligativas.

En el presente trabajo se determinan los coeficientes isotónicos de varias penicilinas semisintéticas, a partir de los datos obtenidos por el método hemolítico. El método seguido para la determinación cuantitativa del grado de hemólisis de los eritrocitos del conejo en disoluciones del antibiótico correspondiente, ha sido el empleado por GROSICKI y HUSA⁵⁴ en la determinación de los valores de «i» para varios aminoácidos y azúcares.

Se han realizado experimentos que nos han llevado a determinar el efecto que tienen las sales de penicilina en la prevención de la hemólisis cuando se emplean en presencia de una concentración de ClNa al 0,2 % p/v.

La sangre utilizada en los distintos experimentos se obtuvo exactamente de la misma forma en que se describe en «Poder hemolítico de Penicilinas». Al objeto de obviar el problema que se presenta con la variabilidad de la misma, la hemólisis que tiene lugar a varias concentraciones de ClNa, se determinó para cada muestra de sangre que se empleó en los

experimentos hemolíticos realizados. De esta forma, cualquier error debido a la variable fragilidad eritrocítica puede ser evitado fácilmente, puesto que cualquier diferencia en la fragilidad de los glóbulos rojos ha sido tenida en cuenta por comparación de la hemólisis en una disolución dada, con la hemólisis en cloruro sódico. En cada experimento se emplean disoluciones por duplicado de todas las concentraciones de las penicilinas correspondientes y de ClNa. En todos los casos se han realizado, cuando menos, dos experimentos para cada antibiótico, empleando dos muestras de sangre del mismo animal.

4.3.1. *Expresión de los términos de actividad.*

El coeficiente de Van't HOFF «i» y el coeficiente osmótico se emplean, regularmente, para cubrir todo tipo de desviación del comportamiento ideal. El coeficiente isotónico «i» de Van't HOFF puede definirse como la relación del efecto coligativo producido por una molalidad dada, al efecto observado de la misma molalidad de un no-electrolito, CADWALLADER.⁵⁵

El coeficiente osmótico introducido por BJERRUM⁵⁶ se define como la relación de una propiedad coligativa observada, a la que debería ser si la disociación fuese completa. La ecuación que relaciona el coeficiente osmótico «g» con el de Van't HOFF «i» es

$$«g» = \frac{«i»}{\gamma} \quad (1)$$

donde γ es el número de iones de un peso-fórmula cualquiera.

Los términos «i» y «g», empleados de esta manera para no electrolitos y electrolitos en disolución, indican el grado de disociación. En disolución de no-electrolitos, ambos términos «i» y «g» tienen un valor máximo de 1. En disoluciones de electrolitos, el valor de «i» se determina por el número de iones en los cuales la molécula puede disociarse y la carga sobre estos iones.

A dilución infinita, el valor de «i» es idéntico al número de iones en los que la molécula del soluto puede disociarse. En las mismas condiciones, el valor de «g» para el ClNa debería ser igual a 1 (es decir, el valor de «i» dividido por el número de iones del peso-fórmula).

En el caso de los electrolitos en disolución, los valores de «i» y de «g» dependen absolutamente de la disociación electrolítica o actividad iónica del electrolito. Los términos «i» y «g» usados a lo largo de este trabajo indican el grado de disociación. Los términos hemolíticos «i» y los valores hemolíticos «g» tienen el especial significado de ser una medida de la actividad hemolítica; es decir, un valor más elevado de «i» para una determinada sustancia indica que ésta proporciona una mayor protección contra la hemólisis de los glóbulos rojos de la sangre que otra sustancia con el

mismo número de iones por peso-fórmula, con el valor de «i» más bajo. Recíprocamente un valor más bajo de «i» para una sustancia indica una mayor actividad hemolítica que un compuesto que, teniendo un número igual de iones, tenga un valor de «i» más elevado.

La actividad hemolítica puede ser definida como la capacidad de una sustancia para ligarse a la hemoglobina de un eritrocito. Por ejemplo, si para un determinado compuesto se preparan una serie de disoluciones de concentraciones variables, y para otro compuesto distinto se preparasen una serie de concentraciones también variables, pero equimolares con respecto a la primera serie, y a ambas disoluciones se les añadiese la misma cantidad de sangre, debería ser mayor la hemólisis en la disolución que contiene el compuesto con el valor de «i» más bajo. Esto mismo debería ser cierto para los valores de «g».

Los valores hemolíticos de «i», más altos o más bajos, que los predichos por la ley límite, se atribuyen a una permeabilidad selectiva de la membrana del glóbulo rojo a los aniones y/o a los cationes en disolución, o a la alteración de integridad de la célula por algún tipo de acción de la sustancia sobre la membrana del eritrocito.

Un compuesto que posea iones que no atraviesen fácilmente la membrana del glóbulo rojo debe de tener valores de «i» más elevados comparativamente que una sustancia que posea iones que penetren fácilmente a través de la membrana.

La ley límite de DEBEY-HUCKEL expresa que la desviación del comportamiento ideal en un disolvente dado está gobernada por la fuerza iónica del medio y las valencias de los iones del electrolito, siendo independiente de su naturaleza química.⁵⁷ El tipo de valencia del electrolito deberá ser, pues, el factor esencial para la determinación de sus coeficientes de actividad, a una fuerza iónica dada. Así, un electrolito 1 : 1, tal como el ClNa, debería tener un valor máximo de 2 para el factor «i» de Van't HOFF, y un valor máximo de 1 para «g». Sin embargo, en muchos casos, los valores de «i» determinados por el método hemolítico son más elevados que los predichos por la ley límite, por lo que, a efectos prácticos, deberían emplearse los términos Valor Hemolítico de «i» y Coeficiente Osmótico Hemolítico de «g», para estos valores que se calculan a partir de los datos biológicos, por ejemplo, el método hemolítico.

4.3.2. *Cálculo del valor de «i».*

HUNTER⁴⁵ ha demostrado, y nosotros hemos comprobado, que cuando se representa en coordenadas rectangulares las concentraciones de cloruro sódico, en orden decreciente en abscisas, y los porcentajes de hemólisis en orden creciente en ordenadas, se obtiene una curva típicamente sigmoide para cada muestra de sangre, similar a la obtenida en la determinación

de los poderes hemolíticos de las mismas. En nuestros experimentos hemos empleado siete concentraciones en el intervalo 0,36-0,54 % p/v. Cuando se emplean los eritrocitos de conejo blanco de Nueva Zelanda no se observa, a 0,54 % p/v de concentración de sal, una hemólisis significativa; en cambio, la hemólisis es completa en la disolución de 0,36 % y p/v de ClNa.

Si conocemos la concentración de ClNa y la de cualquier otro compuesto que produzca el mismo grado de hemólisis, podemos calcular el valor de «i» (Coeficiente Isotónico) para el otro compuesto con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Valor de «i» para el ClNa} \times \text{Grs. de ClNa en 100 ml de disolución}}{\text{Peso molecular del ClNa}} = \frac{\text{Valor de «i» para el otro compuesto} \times \text{Grs. del otro compuesto en 100 ml de disolución}}{\text{Peso Molecular del Compuesto}} \quad (2)$$

El empleo general de esta ecuación es el siguiente: se determina los grados de hemólisis producidos por diferentes concentraciones de ClNa, expresados en porcentaje de p/v a 37°C, y los grados de hemólisis producidos por diferentes concentraciones de antibiótico en agua, a la misma temperatura. Se leen en las respectivas curvas las concentraciones en g/100 ml de ClNa y de antibiótico que producen el 25, 50 y el 75 % de hemólisis, y los valores obtenidos se sustituyen en la ecuación anterior, obteniéndose los correspondientes valores de «i» para la sustancia problema. Este procedimiento implica el conocimiento del coeficiente isotónico para el ClNa, a la temperatura de experimento, del que nos ocupamos a continuación.

A partir de determinaciones hemolíticas, llevadas a cabo a 25°C, HUSA y ADAMS⁵³ han calculado el valor de «i» empleando ClNa como «standard» y 1,86 como valor de «i» para este sal.

En el presente trabajo, todos los experimentos relativos a la determinación de los coeficientes isotónicos han sido realizados a 37°C, lo que hace necesario determinar nuevamente el valor de «i» para el ClNa con objeto de evaluar cualquier posible diferencia respecto a la variación con la temperatura del mismo y comparar los resultados con los obtenidos a 25°C por otros investigadores. Los coeficientes osmóticos han sido calculados, a partir de datos relativos de fuerzas electromotrices y puntos de ebullición, por HARNERD y OWEN,⁵⁸ desde 0° a 40°C, en el intervalo 0,1 — 4 M de concentración de sal. Para el ClNa 0,1 M, el cambio en el coeficiente osmótico desde 0° a 40°C, deducido de los datos de estos autores, no tiene significado alguno.

Por otra parte, es conveniente contrastar con datos hemolíticos el empleo de 1,86 como valor de «i», a 37°C. A este efecto, se realizó un experimento hemolítico en el mismo intervalo de concentraciones de ClNa

(0,36-0,54 % p/v) que para las penicilinas objeto de estudio, utilizando como donador conejo blanco de Nueva Zelanda. El procedimiento es esencialmente el ya descrito en «Poder Hemolítico», excepto que para cada prueba se emplearon cuatro tubos de cada concentración: dos que se mantuvieron a 25°C durante 45 minutos y otros dos que se mantuvieron a 37°C durante el mismo período de tiempo. Los tubos mantenidos a 25°C fueron considerados, en este experimento, como patrones del factor conocido, asignándoles el valor de «i» 1,86 para esta temperatura. Los datos obtenidos se recogen en la Tabla IX.

Cuando los resultados hallados se aplican a la ecuación (I) se obtiene el valor de «i» para el ClNa a 37°C. Este valor calculado a tres porcentajes de hemólisis, de 25, 50 y 75 % resultó ser 1,86, que concuerda excelentemente con los resultados contrastados a 25°C por otros autores, HUSA y ADAMS.⁵³

4.3.3. Valores del coeficiente hemolítico «i» de -aril-oxialquil-penicilinas.

Los resultados obtenidos en los experimentos llevados a cabo para la determinación del tanto por ciento de hemólisis en la curva hipotónica de ClNa, así como los obtenidos cuando la Penicilina V-K se encuentra disuelta en agua destilada en el intervalo de las concentraciones de trabajo, se recogen en las Tablas X y XI. La concentración inicial ha sido la precalculada, a partir de la ley límite, para ser isotónica con la disolución salina 0,54 % p/v. Las concentraciones sucesivas se eligen con arreglo al tanto por ciento de hemólisis obtenido para esa concentración de penicilina. En la gráfica 6 se representan los tantos por ciento de hemólisis producidos por distintas cantidades de ClNa y de antibiótico.

Las Tablas XII y XIII recogen los resultados obtenidos en los experimentos realizados con Feneticilina K. En la gráfica 7 se presentan los grados de hemólisis a distintas concentraciones de ClNa y de antibiótico.

Las Tablas XIV y XV recogen los resultados obtenidos para la Propicilina K. En la gráfica 8 se representa el grado de hemólisis frente a las concentraciones de sal y de antibiótico, respectivamente. En todos los casos se ha empleado sangre procedente de cuatro donadores, siendo las dispersiones obtenidas menores de $\pm 3,0$ %.

Las concentraciones de ClNa leídas de la curva hemolítica hipotónica, que causan un 25 %, 50 % y 75 % de hemólisis, y las concentraciones de la correspondiente penicilina, que causan el mismo grado de hemólisis en disolución acuosa, se hallan recogidas en la Tabla XVI.

Aplicando la ecuación (2) se han determinado los valores de los coeficientes hemolíticos «i» para los tres porcentajes de hemólisis indicados en la Tabla XVI.

TABLA IX

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	0,99	99	—
0,40	0,51	51	—
0,42	0,40	40	—
0,44	0,19	19	—
0,46	0,13	13	—
0,48	0,05	5	—
0,54	0,03	3	7,1

Temperatura = 25°C

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	0,99	99	—
0,40	0,51	51	—
0,42	0,40	40	—
0,44	0,20	20	—
0,46	0,13	13	—
0,48	0,05	5	—
0,54	0,03	3	6,9

(a) pH leído a la concentración de 0,54 % p/v.

TABLA X

Temperatura = 37°C

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	1,00	100	—
0,40	0,50	50	—
0,42	0,40	40	—
0,44	0,25	25	—
0,46	0,18	18	—
0,48	0,12	12	—
0,54	0,03	3	7,0

TABLA XI

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Penicilina V-K g/100 ml	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,50	1,00	100	—
0,75	0,87	87	—
1,00	0,72	72	—
1,25	0,25	25	—
1,50	0,10	10	—
1,75	0,07	7	7,1

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

TABLA XII

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	0,99	99	—
0,40	0,50	50	—
0,42	0,32	32	—
0,44	0,18	18	—
0,46	0,15	15	—
0,48	0,11	11	—
0,54	0,02	2	7,2

TABLA XIII

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Feneticilina K g/100 ml	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,50	1,00	100	—
0,75	0,90	90	—
1,00	0,72	72	—
1,25	0,23	23	—
1,50	0,02	2	—
1,75	0,01	1	7,1

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

TABLA XIV

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	0,99	99	—
0,40	0,50	50	—
0,42	0,29	29	—
0,44	—	—	—
0,46	0,15	15	—
0,48	0,10	10	—
0,54	0,02	2	6,9

TABLA XV

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Propicilina K g/100 ml	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,50	1,00	100	—
0,75	0,87	87	—
1,00	0,58	58	—
1,25	0,27	27	—
1,50	0,12	12	—
1,75	0,05	5	7,2

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

TABLA XVI

	g/100 ml que causan el 25 % de Hemólisis	g/100 ml que causan el 50 % de Hemólisis	g/100 ml que causan el 75 % de Hemólisis
ClNa Penicilina V-K	0,44 1,25	0,42 1,20	0,19 0,95
ClNa Feneticilina K	0,43 1,25	0,40 1,15	0,38 0,96
ClNa Propicilina K	0,42 1,25	0,40 1,14	0,38 0,95

Los resultados encontrados para cada porcentaje de hemólisis, así como su valor medio del coeficiente isotónico, se recogen en la Tabla XVII.

TABLA XVII

Antibiótico	Valor de «i» para el 25 % de Hemólisis	Valor de «i» para el 50 % de Hemólisis	Valor de «i» para el 75 % de Hemólisis	Valor medio de «i»
Penicilina V-K	4,34	4,42	5,06	4,60
Feneticilina K	4,38	4,45	5,00	4,65
Propicilina K	4,44	4,64	5,28	4,78

Los valores de los coeficientes osmóticos «g», calculados a partir de los valores de los coeficientes hemolíticos «i» de las sales sódicas de las penicilinas de esta serie, aplicando la expresión (1), se recogen en la Tabla XVIII.

TABLA XVIII

Antibiótico	Valor de «g» para el 25 % de Hemólisis	Valor de «g» para el 50 % de Hemólisis	Valor de «g» para el 75 % de Hemólisis
Penicilina V-K	2,17	2,21	2,53
Feneticilina K	2,19	2,23	2,56
Propicilina K	2,22	2,32	2,64

4.3.4. Valores del coeficiente hemolítico «i» de isoxazol penicilinas.

La pauta seguida para la determinación de los valores «i», en esta serie de penicilinas, es similar a la descrita para las α -aril-oxialquil penicilinas. Las tablas XIX, XX, XXI, XXII, XXIII y XXIV recogen los datos obtenidos de los grados de hemólisis de la curva hipotónica del ClNa y la correspondiente penicilina estudiada comparativamente, es decir, ClNa-Oxicilina Na, ClNa-Cloxacilina Na y ClNa—2,6-Dicloxacilina Na.

En las gráficas 9-11 se representan los porcentajes de hemólisis producidos por distintas concentraciones de ClNa y de antibiótico, a 37°C.

TABLA XIX

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	0,99	99	—
0,40	0,50	50	—
0,42	0,35	35	—
0,44	0,20	20	—
0,46	0,14	14	—
0,48	0,11	11	—
0,54	0,03	3	6,9

TABLA XX

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Oxacilina Na g/100 ml	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,50	1,00	100	—
1,00	0,75	75	—
1,25	0,50	50	—
1,50	0,20	20	—
1,75	0,11	11	—
2,00	0,04	4	6,9

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

TABLA XXI

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	1,00	100	—
0,40	0,56	56	—
0,42	0,39	39	—
0,44	0,25	25	—
0,46	0,18	18	—
0,48	0,12	12	—
0,54	0,03	3	7,0

TABLA XXII

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Cloxacilina Na g/100 ml	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
—	—	—	—
1,00	1,00	100	—
1,25	0,75	75	—
1,50	0,50	50	—
1,75	0,27	27	—
2,00	0,06	6	7,1

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

TABLA XXIII

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	1,00	100	—
0,40	0,56	56	—
0,42	0,39	39	—
0,44	0,25	25	—
0,46	0,13	13	—
0,48	0,12	12	—
0,54	0,02	2	7,0

TABLA XXIV

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

2,6, Dicloxacilina Na g/100 ml	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
1,00	1,00	100	—
1,50	0,75	75	—
1,75	0,50	50	—
2,00	0,28	28	—
2,50	0,09	9	7,2

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

Los datos correspondientes a las concentraciones de ClNa leídas en la curva hipotónica, que causan un 25 %, 50 % y 75 % de hemólisis, y las concentraciones de la correspondiente penicilina, que causan el mismo porcentaje de hemólisis en disolución acuosa, se recogen en la Tabla XXV.

TABLA XXV

	g/ml que causan 25 % de Hemólisis	g/100 ml que causan 50 % de Hemólisis	g/100 ml que causan 75 % de Hemólisis
ClNa	0,43	0,40	0,38
Oxacilina Na	1,75	1,20	1,00
ClNa	0,44	0,41	0,38
Cloxacilina Na	1,60	1,45	1,25
ClNa	0,43	0,41	0,38
2,6-Dicloxacilina Na	2,05	1,75	1,50

Los valores de coeficientes hemolíticos «i» han sido calculados de acuerdo con la ecuación (2), a los porcentajes de hemólisis dados en la Tabla precedente.

Los resultados hallados del coeficiente hemolítico «i» para cada tanto por ciento de hemólisis, así como su valor medio, se expresan en la Tabla XXVI.

TABLA XXVI

Antibiótico	Valor de «i» para el 25 % de Hemólisis	Valor de «i» para el 50 % de Hemólisis	Valor de «i» para el 75 % de Hemólisis	Valor medio de «i»
Oxacilina Na	4,30	4,39	5,00	1,57
Cloxacilina Na	4,16	4,28	4,35	1,26
2,6-Dicloxacilina Na	3,40	3,70	4,11	3,71

Los valores de los coeficientes osmóticos «g», calculados a partir de los valores de los coeficientes hemolíticos «i» de las sales sódicas de las penicilinas de esta serie, aplicando la expresión (1), se recogen en la Tabla XXVII.

En la gráfica 12 se representan los valores de los coeficientes osmóticos en ordenadas, en función de los porcentajes de hemólisis a lo largo de las abscisas, sirviéndonos esta representación como medio de comparación de las actividades hemolíticas de las sales sódicas de las penicilinas estudiadas. Puesto que todos los compuestos son sales sódicas o potásicas, la influencia del catión se ha mantenido constante en cada serie. En la gráfica 12 están representados los coeficientes osmóticos «g» en función de los grados de hemólisis al 25 %, 50 % y 75 % para las dos series de penicilinas experimentadas.

TABLA XXVII

Atibiótico	Valor de «g» para el 25 % Hemólisis	Valor de «g» para el 50 % Hemólisis	Valor de «g» para el 75 % Hemólisis
Oxacilina Na	2,15	2,20	2,50
Cloxacilina Na	2,08	2,14	2,18
2,6-Dicloxacilina Na	1,70	1,85	2,06

4.3.5. Efecto de la adición de electrolito.

Ha sido comprobado por HÖBER (26) que la permeabilidad anómala de eritrocitos en disoluciones de algunos no electrolitos puede ser corregida, en muchos casos, por adición de una pequeña proporción de un electrolito, por ejemplo de ClNa. Los resultados hallados por nosotros, que se recogen en las Tablas XXVIII, XXIX, XXX y XXXI apoyan esta idea, puesto que para eritrocitos de conejo la presencia de 0,2 % p/v de ClNa reduce el valor del coeficiente aparente «i» para las dos penicilinas representativas de cada una de las series estudiadas. Este fenómeno observado en nuestros experimentos concuerda con los observados por otros autores (26) y (28).

TABLA XXVIII

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	1,00	100	—
0,40	0,53	53	—
0,42	0,44	44	—
0,44	—	—	—
0,46	0,20	20	—
0,48	0,14	14	—
0,54	0,03	3	6,9

TABLA XXIX

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

2,6-Dicloxacilina Na g/100 ml (b)	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,25	—	—	—
0,50	0,95	95	—
0,75	0,85	85	—
1,00	0,50	50	—
1,25	0,27	27	—
1,50	0,16	16	7,1

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

(b) Tanto por ciento de 2,6-Dicloxacilina en disolución 0,2 % p/v de ClNa.

TABLA XXX

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

Concentración % ClNa p/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,36	1,00	100	—
0,40	0,51	51	—
0,42	0,36	36	—
0,44	0,25	25	—
0,46	0,15	15	—
0,48	0,10	10	—
0,54	0,02	2	7,0

TABLA XXXI

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

2,6-Dicloxacilina Na g/100 ml (b)	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
0,25	0,87	87	—
0,50	0,75	75	—
0,75	0,30	30	—
1,00	0,18	18	—
1,25	0,11	11	—
1,50	0,06	6	7,1

(a) pH correspondiente a la disolución más concentrada.

(b) Tanto por ciento de 2,6-Dicloxacilina en disolución 0,2 % p/v de ClNa.

Las concentraciones de Feneticilina K y de 2,6-Dicloxacilina Na, que causan el 25 %, el 5 % y el 75 % de hemólisis, a 37°C, se recogen en la Tabla XXXII. En esta misma Tabla se recogen también las concentraciones de ClNa que causan los mismos porcentajes de hemólisis obtenidos restando el valor constante de 0,2 % p/v a los correspondientes de la curva hipotónica.

A partir de la ecuación (2) se han calculado los correspondientes coeficientes isotónicos o hemolíticos aparentes «i», en presencia de 0,2 % p/v de Cl Na para las dos penicilinas estudiadas. La Tabla XXXIII recoge estos valores y el del coeficiente hemolítico medio.

TABLA XXXII

	g/100 ml que causan 25 % de Hemólisis	g/100 ml que causan 50 % de Hemólisis	g/100 ml que causan 75 % de Hemólisis
ClNa Feneticilina K	0,44 0,85	0,40 0,60	0,38 0,50
ClNa 2,6-Dicloxacilina Na	0,45 1,25	0,11 1,00	0,39 0,90

TABLA XXXIII

Antibiótico	Valor de «i» para el 25 % Hemólisis	Valor de «i» para el 25 % Hemólisis	Valor de «i» para el 75 % Hemólisis	Valor medio de «i»
Feneticilina K	3,61	4,26	4,60	4,16
2,6-Dicloxacilina Na	3,24	3,30	3,42	3,32

4.4. *Influencia de los Polietilenglicoles (PEG) sobre la actividad hemolítica de las penicilinas semisintéticas.*

El método colorimétrico empleado en este estudio para la determinación del grado de hemólisis ha sido el descrito en la Parte Experimental. Las únicas variaciones en el procedimiento estriban en el empleo de sangre de conejo blanco de Nueva Zelanda y el aumento de la velocidad de centrifugación a 3.000-4.000 r.p.m., a causa del rápido incremento de la viscosidad de las disoluciones de trabajo, con el aumento de la proporción de polímero.

Cada una de las disoluciones de Polietilenglicol-Agua y de Polietilenglicol-Agua-ClNa han sido preparadas sobre la base de tanto por ciento peso/volumen, ya sea en presencia del antibiótico correspondiente, o bien en ausencia del mismo.

El pH se determinó antes y después de su mezcla con la sangre, por medio de un pH-metro tipo Beckman Zeromatic. Cada una de las disoluciones de trabajo, en ausencia del antibiótico, tiene un pH inicial de 4,6-5,5 para el PEG-1540, y de 6,6-7,0 para el PEG-600, obteniéndose invariablemente valores de pH comprendidos entre 6,8-7,3 después de adicionar la sangre en ambos casos, cambio atribuido, naturalmente, a la acción reguladora de la sangre de conejo.

Los sistemas solución salina-PEG o agua-PEG absorben una pequeña cantidad de luz y su absorbancia aumenta con el incremento en el contenido de PEG. Esta absorbancia se determinó para varias concentraciones del polímero empleado en los experimentos y los blancos leídos, restados de las lecturas colorimétricas obtenidas al final de cada experimento de hemólisis, concuerdan perfectamente con los resultados obtenidos sin establecer ningún tipo de corrección.

4.4.1. *Comportamiento de los eritrocitos en el sistema Agua-Polietilenglicol.*

El comportamiento hemolítico de los eritrocitos humanos y de conejo en disoluciones acuosas de PEG-200, 300 y 400, ha sido investigado por SMITH y CADWALLADER,⁵⁹ encontrando que se produce una hemólisis completa en todas las disoluciones de PEG-200 y 300, con decoloración a elevadas concentraciones del polímero correspondiente. El ClNa resultó efectivo en la prevención de esta hemólisis cuando la concentración de PEG-200 fue igual o menor al 25 %, e igual o menor al 40 % cuando se trató del PEG-300. El PEG-400 protege a los glóbulos rojos de su alteración empleando disoluciones que contienen más del 10 % y menos del 40 % p/v. En nuestro trabajo se han empleado polímeros de grado de condensación más elevado, PEG-600 y PEG-1.540, a concentraciones que oscilan entre el 0,5 % al 10 % p/v.

El hecho de que los polietilenglicoles sean tratados como solutos protectores induce a comprobar la posible isosmotividad de estos polímeros, a las concentraciones habituales de trabajo, con objeto de evitar la presencia de ClNa en el medio. La Tabla XXXIV recoge los resultados obtenidos para estos dos polímeros.

TABLA XXXIV

Temperatura = 37°C.

Tiempo incubación = 45 min.

PEG-600 % p/v	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
2	1,00	100	7,1	7,3
4	0,78	78	7,0	7,3
6	0,50	50	7,0	7,2
8	0,22	22	6,9	7,0
10	0,02	2	6,9	7,1

PEG-1.540 % p/v	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
2	0,98	98	5,1	6,9
4	0,67	67	5,0	6,9
6	0,34	34	4,8	7,0
8	0,02	2	4,8	6,9
10	0,02	2	4,6	6,8

En la gráfica 13 se registra el grado de hemólisis de eritrocitos de conejo blanco de Nueva Zelanda después de un período de incubación de 45 minutos, observándose que a valores menores de un 5 % de PEG-600 ó PEG-1.540 existe un grado de hemólisis apreciable en ambos casos que hace necesaria la adición de ClNa para proporcionar una protección completa y prevenir de la hemólisis osmótica a los eritrocitos de conejo.

4.4.2. Comportamiento de los eritrocitos en el sistema disolución salina-polietilenglicol.

Para demostrar que la estabilidad del eritrocito, en ausencia de los agentes hemolíticos, no tiene relación alguna con la concentración de PEG empleada en cada caso, hemos efectuado un estudio preliminar del comportamiento del glóbulo rojo en sistemas PEG-disolución salina 0,6 % p/v (ó 0,093 M), en un amplio intervalo de concentraciones de alcohol polihídrico. La Tabla XXXV recoge los resultados obtenidos por distintas mezclas de PEG-600 y PEG-1.540 con disolución salina 0,6 % p/v. Los datos que se refieren a este estudio de hemólisis representan, como mínimo, el valor medio de cuatro experimentos.

En la gráfica 14 se representan los tantos por ciento de hemólisis, después de un período de incubación de 45 minutos, a 37°C, frente a los porcentajes del correspondiente PEG en disolución salina 0,6 % p/v. Como puede observarse en la gráfica 14, los porcentajes de PEG-600 y PEG-1.540 inferiores al 20 %, no causan ninguna alteración en la estabilidad del glóbulo rojo.

TABLA XXXV

PEG-600 % p/v	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
0	0,01	1,0	6,9	7,2
5	0,01	1,0	7,0	7,2
10	0,01 ₅	1,5	7,0	7,3
15	0,02	2,0	6,9	7,2
20	0,02	2,0	6,9	7,1

LEG-1.540 % p/v	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
0	0,01	1,0	5,4	7,1
5	0,01	1,0	5,4	7,0
10	0,02	2,0	5,0	7,2
15	0,01 ₅	1,5	5,1	7,1
20	0,02	2,0	4,9	7,2

Si bien es cierto que nuestras concentraciones de trabajo han sido inferiores al 10 %, se ha trabajado con una concentración doble al objeto de observar el fenómeno en cuanto a su extrapolación se refiere. En el PEG-600 se ha empleado, excepcionalmente, una concentración de polímero del 40 % p/v, observándose el fenómeno de decoloración.

4.4.3. Inhibición de la actividad hemolítica de α -aril-oxialquil penicilinas por PEG-600 y PEG-1.540.

Los experimentos que conducen a la determinación de las actividades hemolíticas de los tres primeros términos de esta serie, en presencia de ClNa al 0,6 % p/v (0,093 M), han sido recogidos en las sección RESULTADOS (Actividad hemolítica de penicilinas semisintéticas). Las expresiones, tanto físicas como químicas, de la concentración de cada antibiótico, suficientes para una hemólisis total (100 %), se recogen en la Tabla XXXVI.

TABLA XXXVI

Antibiótico	Hemólisis total g/100 ml	Hemólisis total mol l ⁻¹ .10 ⁻²	pH inicial	pH final
Penicilina V-K	3,75	9,6	6,4	6,9
Feneticilina K	3,90	9,8	6,2	7,1
Propicilina K	3,95	9,5	6,3	7,0

Los valores correspondientes al grado de hemólisis empleando estas concentraciones, en disoluciones de distintas proporciones de PEG-600 y PEG-1.540, se recogen en las Tablas XXXVII, XXXVIII y XXXIX.

TABLA XXXVII

Penicilina V-K

 $c = 9,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

PEG-600 % p/v	PEG-600 equiv. l^{-1}	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH (a) inicial	pH (a) final
0,24	0,05	0,85	85	6,6	7,2
0,48	0,10	0,51	51	6,6	7,1
0,96	0,20	0,19	19	6,8	7,2
1,92	0,40	0,05	5	6,9	7,3
2,88	0,60	0,01	1	6,8	7,1

PEG-1.540 % p/v	PEG-1.540 equiv. l^{-1}	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH (a) inicial	pH (a) final
0,24	0,05	0,60	60	5,7	7,0
0,48	0,10	0,18	18	5,6	7,0
0,96	0,20	0,08	48	5,5	7,2
1,92	0,40	0,01	1	5,5	7,1
2,88	0,60	0,01	1	5,3	6,9

(a) Valor de pH de la disolución, una vez agregado el antibiótico.

TABLA XXXVIII

Feneticilina K

 $c = 9,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

PEG-600 % p/v	PEG-600 equiv. l^{-1}	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
0,96	0,20	1,00	100	6,7	7,2
1,92	0,40	0,97	97	6,8	7,3
2,88	0,60	0,60	60	6,8	7,2
3,84	0,80	0,20	20	6,6	7,1
4,80	1,00	0,03	3	6,8	7,3

PEG-1.540 % p/v	PEG-1.540 equiv. l^{-1}	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	inicial	final
0,24	0,05	0,98	98	5,6	7,0
0,48	0,10	0,93	93	5,7	7,2
0,95	0,20	0,45	45	5,6	7,2
1,92	0,40	0,09	9	5,5	7,1
2,88	0,60	0,01	1	5,3	7,1

TABLA XXXIX

Feneticilina K

$$c = 9,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$$

PEG-600 % p/v	PEG-600 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
0,96	0,20	1,00	100	6,8	7,1
1,92	0,40	0,99	99	6,4	7,0
2,88	0,60	0,58	58	6,8	7,2
3,84	0,80	0,24	24	6,5	7,1
4,80	1,00	0,03	3	6,8	7,2

PEG-1.540 % p/v	PEG-1.540 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
0,24	0,05	0,99	99	5,5	7,2
0,48	0,10	0,94	94	5,3	7,2
0,96	0,20	0,48	48	5,3	7,1
1,92	0,40	0,12	12	5,2	7,1
2,88	0,60	0,02	2	5,2	7,0

Las gráficas 15-A, 15-B y 16 representan el grado de hemólisis a distintas concentraciones de PEG-600 y PEG-1.540, expresadas en equiv. l⁻¹. Estas concentraciones se han calculado sobre la unidad base que se repite, esto es, equivalentes-gramo del monómero óxido de etileno (-o-CH₂-CH₂) por litro de disolución.

4.4.A. Inhibición de la actividad hemolítica de isoxazoil-penicilinas por PEG-600 y PEG-1.540.

Las concentraciones que causan justamente el 100 % de hemólisis en presencia de una disolución 0,093 M de ClNa han sido recogidas en la sección «Poder hemolítico de penicilinas semisintéticas». Los valores expresados en peso de la penicilina correspondiente, por 100 ml de disolución y en concentraciones molares, se recogen en la Tabla XL. Los valores correspondientes al grado de hemólisis hallados, a las concentraciones de penicilina indicadas, en disoluciones de distintas proporciones de PEG-600 y PEG-1.540, se recogen en las Tablas XLI, XLII y XLIII. Las representaciones gráficas se dan en las gráficas 17 y 18.

TABLA XL

Antibiótico	Hemólisis total g/100 ml	Hemólisis total mol l ⁻¹ · 10 ²	pH inicial	pH final
Oxacilina Na	3,00	7,8 ₀	5,8	6,9
Cloxacilina Na	2,15	4,8 ₀	5,8	6,9
2,6-Dicloxacilina Na	1,25	2,5 ₅	5,9	7,2

El conjunto de gráficas nos permite la observación de un fenómeno de unión o «binding» de los PEG-600 y PEG-1.540 con las penicilinas correspondientes a las dos series estudiadas, puesto que hay una disminución evidente del grado de hemólisis en todos los casos cuando el antibiótico llega a interaccionar en mayor extensión con la macromolécula.

4.5. Influencia del Dimetilsulfóxido (DMSO) sobre la actividad hemolítica de las penicilinas semisintéticas.

El método colorimétrico empleado en la determinación cuantitativa de la hemólisis de eritrocitos del conejo blanco de Nueva Zelanda «in vitro» ha sido previamente descrito en la sección 3.4.4.

Muy brevemente, recordamos que el método implica la adición de 0,05 ml de sangre desfibrinada a los tubos colorimétricos que contienen 10 ml de la disolución problema. Las muestras problema se incuban en baño María durante 45 minutos, a 37°C, y las células no hemolizadas se

TABLA XLI

Oxacilina Na

 $c = 7,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

PEG-600 % p/v	PEG-600 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial (a)	pH final
0,96	0,20	0,97	97	6,3	6,9
1,92	0,40	0,82	82	6,4	6,9
2,88	0,60	0,56	56	6,6	7,0
4,80	1,00	0,09	9	6,5	7,2
5,76	1,20	0,01	1	6,5	7,3

Oxacilina Na

 $c = 7,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

PEG-1.540 % p/v	PEG-1.540 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial (a)	pH final
0,24	0,05	0,95	95	6,4	7,0
0,48	0,10	0,83	83	6,4	6,9
0,96	0,20	0,49	49	6,6	7,1
1,92	0,40	0,07	7	6,5	7,2
2,88	0,60	0	0	6,7	7,3

(a) Los pH iniciales corresponden a los leídos una vez añadida la Oxacilina.

TABLA XLII

Cloxacilina Na

 $c = 4,7 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

PEG-600 % p/v	PEG-600 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial (a)	pH final
0,96	0,20	0,92	92	6,4	6,8
1,92	0,40	0,81	81	6,4	6,9
2,88	0,60	0,61	61	6,6	7,1
4,80	1,00	0,12	12	6,5	7,0
5,76	1,20	0,01	1	6,4	6,9

Cloxacilina Na

 $c = 4,7 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

PEG-1.540 % p/v	PEG-1.540 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial (a)	pH final
0,24	0,05	0,96	96	6,6	7,0
0,48	0,10	0,89	89	6,6	7,1
0,96	0,20	0,64	64	6,7	7,1
1,92	0,40	0,18	18	6,6	7,2
2,88	0,60	0,02	2	6,7	7,2

(a) Los pH iniciales corresponden a los valores de las disoluciones una vez añadida la Cloxacilina.

TABLA XLIII

2,6-Dicloxacilina Na $c = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol. l}^{-1}$

PEG-600 % p/v	PEG-600 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial (a)	pH final
0,96	0,20	0,92	92	6,7	6,9
1,92	0,40	0,77	77	6,7	7,0
2,88	0,60	0,56	56	6,6	7,1
4,80	1,00	0,10	10	6,6	7,0
5,76	1,20	0,03	3	6,7	7,2

2,6-Dicloxacilina Na $c = 2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

PEG-1540 % p/v	PEG-1540 equiv. l ⁻¹	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial (a)	pH final
0,24	0,05	0,98	98	6,5	6,9
0,48	0,10	0,90	90	6,7	7,2
0,96	0,20	0,70	70	6,7	7,1
1,92	0,40	0,20	20	6,9	7,1
2,88	0,60	0,03	3	6,9	7,2

(a) Los pH iniciales corresponden a los valores de las disoluciones una vez añadida la 2,6-Dicloxacilina.

sedimentan por centrifugación, leyendo la absorbancia del sobrenadante en el Colorímetro Spectronic-20. Durante el período de incubación y al final del mismo, cada muestra se observa macroscópicamente a efectos de los posibles cambios de color ocurridos, precipitación u otros signos de desnaturalización.

4.5.1. *Comportamiento de los eritrocitos en el sistema disolución salina/DMSO.*

Nuestros estudios previos han servido para demostrar que el DMSO en agua, a las concentraciones empleadas a lo largo de nuestras investigaciones, es un agente químico que causa hemólisis total en todos los casos. La Tabla XLIV recoge los resultados obtenidos para cuatro concentraciones de DMSO expresadas en tanto por ciento v/v. En la gráfica 19 se representan los tantos por ciento de hemólisis frente a diferentes concentraciones de DMSO en la mezcla.

TABLA XLIV

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
5	0,96	96	7,3	7,0
15	1,00	100	7,4	7,1
20	1,05	100	7,4	7,2
30	1,05	100	7,4	7,2
40 Signos de desnaturalización				

Para obviar esta dificultad se recurre al empleo de la disolución salina 0,093 M (0,6 % p/v) como agente protector extracelular de la hemólisis osmótica. De esta forma, cualquier hemólisis que se produzca en las mezclas solución salina 0,6 % p/v + DMSO, a las concentraciones de trabajo de este último, se debe atribuir exclusivamente a la actividad hemolítica del DMSO.

La Tabla XLV recoge los resultados obtenidos para varias mezclas solución salina + DMSO, observándose que a niveles superiores al 25 % v/v de DMSO producen un incremento en el grado de hemólisis que se acusa con el aumento de la concentración de DMSO, y a concentra-

ciones superiores al 40 % v/v comienzan a observarse fenómenos de franca desnaturalización. Los efectos de alteración, causados por niveles elevados de DMSO sobre la sangre, se observan con una decoloración del líquido extracelular que va del ámbar al marrón, floculación de los componentes de la sangre y la precipitación de la hemoglobina de los eritrocitos dañados. HUGGINS (39) informa sobre la interacción entre el DMSO y proteínas de plasma, señalando que la desnaturalización de las proteínas se presenta a concentraciones de DMSO del 35-40 % v/v. El mismo autor comprobó que la precipitación de proteínas por DMSO tiene lugar con fracciones individuales del plasma (albúmina, fibrinógeno, gamma globulina) y parece que se debe más a un efecto general que a la desnaturalización de un componente específico del mismo.

TABLA XLV

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	pH inicial	pH final
5	0,01	1	7,2	7,0
10	0,02	2	7,3	7,1
20	0,06	6	7,3	7,1
25	0,16	16	7,4	7,1
30	0,35	35	7,4	7,2
40 Signos de precipitación y decoloración				

4.5.2. Influencia del DMSO sobre la hemólisis inducida por Feneticilina K y Oxacilina Na.

Influencia de la concentración de antibióticos.

La influencia del DMSO sobre la hemólisis de eritrocitos de conejo «in vitro», producida por un término de cada serie de penicilinas semisintéticas experimentadas, se ha estudiado a distintas concentraciones molares de Feneticilina K y Oxacilina Na, en presencia de 0,6 % p/v de ClNa. Las concentraciones molares elegidas han sido las que producen un 10 %, 50 % y 100 % de hemólisis y, además, una cuarta concentración superior a la concentración molar crítica que causa hemólisis total (100 %). La Tabla XLVI recoge los valores de las concentraciones de trabajo expresadas en moles por litro para cada antibiótico.

TABLA XLVI

Concentración molar de antibiótico
que causan 10 %, 50 % y 100 % de hemólisis

Antibiótico	10 %	50 %	100 %	
Feneticilina K	$3,7 \cdot 10^{-2}$	$6,6 \cdot 10^{-2}$	$9,8 \cdot 10^{-2}$	$12,2 \cdot 10^{-2}$ (a)
Oxacilina Na	$3,2 \cdot 10^{-2}$	$4,8 \cdot 10^{-2}$	$7,8 \cdot 10^{-2}$	$9,0 \cdot 10^{-2}$ (a)

Los valores de esta Tabla corresponden a un mínimo de 2 ó 4 experiencias realizadas a 37°C. durante 15 minutos.

(a) Concentración de la correspondiente penicilina a un valor superior de la hemólisis total.

Para cada concentración de Feneticilina K u Oxacilina Na se determinó el grado de hemólisis a distintos porcentajes de DMSO en la mezcla. Las Tablas XLVII, XLVIII, XLIX y L recogen los resultados obtenidos a distintas concentraciones de Feneticilina K en la disolución a medir. La gráfica 20 registra el grado de hemólisis frente a los tantos por ciento de DMSO.

TABLA XLVII

Feneticilina K

$c = 3,7 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
5	0,08	8	6,5	7,0
10	0,05	5	6,5	7,1
15	0,02	2	6,7	7,1
20	0,07	7	6,7	7,0
25	0,18	18	6,6	7,0
30	0,40	40	6,6	6,9
40	0,83	82	6,7	6,9

La eficiencia del DMSO, para cada concentración del mismo en la mezcla, en la prevención de la hemólisis decrece, como se desprende de estos valores, con el aumento de la concentración de Feneticilina K en la disolución.

TABLA XLVIII

Feneticilina K

$$c = 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$$

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	Hemólisis	pH inicial	pH final
5	0,30	30	6,6	7,1
10	0,23	23	6,6	7,0
15	0,15	15	6,5	7,1
20	0,11	11	6,4	7,0
25	0,20	20	6,5	6,9
30	0,45	45	6,6	7,2
40	0,86	86	6,6	7,2

Las Tablas LI-LIV recogen los resultados experimentales para la Oxacilina Na a distintas concentraciones de la misma. En la gráfica 20 se representan los porcentajes de hemólisis frente a distintas concentraciones de DMSO en la mezcla final. El perfil de las curvas grado de hemólisis —% DMSO es similar en las dos penicilinas experimentadas. En el caso de la Oxacilina Na el intervalo de concentración empleado fue sumamente pequeño, debido a la ligera diferencia entre las cantidades que causan hemólisis total, hemólisis intermedia (50 %) y hemólisis incipiente (10 %), por lo que no es extraño que en algunos de los resultados recogidos se encuentre un solapamiento y se entrecrucen las curvas en su representación gráfica.

4.5.3. Estudios espectrales.

Las dos penicilinas representativas de las series estudiadas y por tanto, de diferente estructura química en cuanto al radical unido al ácido 6-aminopenicilánico se refiere, han sido objeto, por nuestra parte, de un examen espectral, solas y en unión de DMSO al 20 % v/v en orden a detectar la posible interacción química penicilina-DMSO.

Esta interacción debería de ocurrir para un decrecimiento de la actividad hemolítica producida por la Feneticilina K y la Oxacilina Na cuando se adiciona DMSO. Para su determinación se ha empleado un espectrofotómetro Beckman DK-2, habiéndose estimado cada penicilina en el máximo de absorción a 267 mμ y 275 mμ, respectivamente.

El DMSO no tiene absorbancia alguna por encima de las 250 mμ, por lo que su combinación con la penicilina no interfiere con la determinación de la concentración de la misma.

TABLA XLIX

Feneticilina K

$$c = 9,8 \cdot 10^{-2} \text{ moles l}^{-1}$$

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
5	0,75	75	6,4	6,9
10	0,58	58	6,5	6,9
15	0,30	30	6,4	7,0
20	0,18	18	6,6	7,1
25	0,25	25	6,4	6,9
30	0,57	57	6,3	6,9
40	0,95	95	6,6	7,1

TABLA L

Feneticilina K

$$c = 12,2 \cdot 10^{-2} \text{ moles l}^{-1}$$

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
5	1,00	100	6,6	6,9
10	1,00	100	6,7	6,9
15	0,99	99	6,7	7,0
20	0,99	99	6,4	6,9
25	0,99	99	6,5	7,1
30	1,00	100	6,8	7,2
40	1,00	100	6,8	7,2

TABLA LI

Oxacilina Na

 $c = 3,2 \cdot 10^{-2}$ moles l^{-1}

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
5	0,07	7	6,5	6,9
10	0,06	6	6,6	7,0
15	0,06	6	6,7	7,1
20	0,10	10	6,7	7,2
25	0,12	12	6,6	6,9
30	0,30	30	6,8	7,1
40	0,77	77	6,8	7,2

TABLA LII

Oxacilina Na

 $c = 4,8 \cdot 10^{-2}$ moles l^{-1}

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
5	0,60	60	6,6	7,1
10	0,40	40	6,6	7,1
15	0,30	30	6,8	7,2
20	0,20	20	6,7	7,2
25	0,08	8	6,8	7,2
30	0,35	35	6,8	7,3
40	0,75	75	6,9	7,3

TABLA LIII

Oxacilina Na

 $c = 7,8 \cdot 10^{-2}$ moles l^{-1}

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
5	1,00	100	6,4	6,9
10	0,95	95	6,5	6,9
15	0,60	60	6,6	7,1
20	0,50	50	6,7	7,0
25	0,40	40	6,7	7,1
30	0,55	55	6,8	7,2
40	0,95	95	6,8	7,1

TABLA LIV

Oxacilina Na

 $c = 9,0 \cdot 10^{-2}$ moles l^{-1}

DMSO % v/v	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH inicial	pH final
5	1,00	100	6,4	6,8
10	1,00	100	6,4	6,9
15	1,00	100	6,6	7,0
20	1,00	100	6,7	7,0
25	1,00	100	6,7	7,1
30	1,00	100	6,8	7,2
40	1,00	100	6,8	7,2

Para cada experimento se emplearon células de referencia debidamente preparadas.

Los espectros demuestran que, aproximadamente, la totalidad del antibiótico está presente en la mezcla penicilina-DMSO, incluso en un período de tiempo suficientemente amplio; del orden de tres veces superior al período normal de incubación, lo que hace suponer que no existe ningún tipo de interacción penicilina DMSO.

Los espectros U V. de las dos penicilinas a la hora cero, en agua y para tres tiempos distintos en agua-DMSO se recogen a continuación:

4.6. Estudios cinéticos.

4.6.1. a) Cinética hemolítica.

Con objeto de determinar si el efecto del DMSO en la disminución del grado de hemólisis producida por el antibiótico está, o no, relacionado con el tiempo, se realizaron una serie de experimentos empleando una concentración constante de penicilina, en cada caso, la que causa el 50 %, aproximadamente, de hemólisis, y dos concentraciones de DMSO (5 % y 20 %): la primera, de escaso efecto protector, y la segunda, que corresponde al porcentaje de óptima protección eritrocítica.

La actividad hemolítica se determinó a intervalos variables de 5 a 20 minutos, durante períodos de tiempo de hasta 120 minutos.

En la Tabla LV se recogen los resultados obtenidos en el experimento patrón, es decir, la cinética hemolítica a concentración cero de DMSO.

TABLA LV

Feneticilina K $c = 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$			Oxacilina Na $c = 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$	
Incubación a 37°C Tiempo en minutos	Absorbancia (E)	% de Hemólisis	Absorbancia (E)	% de Hemó- lisis
5	0,05	5	0,14	14
10	0,07	7	0,16	16
20	0,14	14	0,25	25
30	0,30	30	0,35	35
45	0,53	53	0,52	52
60	0,69	69	0,85	85
120	1,00	100	1,00	100

En las Tablas LVI y LVII se recogen los resultados hallados para dos concentraciones de DMSO (5 % y 20 %) frente a una misma concentración inicial de Feneticilina Na y Oxacilina Na.

TABLA LVI

Feneticilina K $c = 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ DMSO $c = 5 \% \text{ v/v}$

Incubación a 37°C Tiempo en minutos	Absorbancia (E)	Hemólisis	pH (a)
5	0,03	3	6,9
10	0,05	5	
20	0,07	7	
30	0,10	10	
45	0,30	30	
60	0,40	40	
120	0,92	92	

Feneticilina K $c = 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ DMSO $c = 20 \% \text{ v/v}$

Incubación a 37°C Tiempo en minutos	Absorbancia (E)	Hemólisis	pH (a)
5	0,02	2	6,9
10	0,03	3	
20	0,05	5	
30	0,05	5	
45	0,10	10	
60	0,14	14	
120	0,65	65	

TABLA LVII

Oxacilina Na $c = 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ DMSO $c = 5\% \text{ v/v}$

Incubación a 37°C Tiempo en minutos	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
5	0,12	12	7,0
10	0,13	13	
20	0,22	22	
30	0,29	29	
45	0,40	40	
60	0,55	55	
120	1,00	100	

Oxacilina Na $c = 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ DMSO $c = 20\% \text{ v/v}$

Incubación a 37°C Tiempo en minutos	Absorbancia (E)	% Hemólisis	pH (a)
5	0,08	8	6,8
10	0,09	9	
20	0,14	14	
30	0,17	17	
45	0,25	25	
60	0,33	33	
120	0,85	85	

En las gráficas 21a y 21b se representan los grados de hemólisis encontrados frente al tiempo, en minutos, para los niveles de DMSO ensayados en cada antibiótico.

Como puede verse, la adición de DMSO a disoluciones $6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ de Feneticilina Na y $4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ de Oxacilina Na, en disolución salina, disminuye sensiblemente la velocidad de hemólisis a concentraciones del 20 % de DMSO, siendo poco efectiva cuando la concentración del disolvente es solamente del 5 %.

4.6.2. b) Cinética de degradación.

Al objeto de contrastar la bondad de los resultados obtenidos en análisis espectral, se ha seguido la cinética de degradación de ambos antibióticos, al pH de disolución de los mismos en la mezcla solución salina 0,093 M — DMSO, a 37°C, y a las concentraciones de sustrato empleadas en la cinética hemolítica. Para la determinación del porcentaje de penicilina activa, en presencia de sus productos de degradación, se ha seguido el método empleado por ORTENBLAD.⁶⁰ Las Tablas LVIII y LIX recogen los resultados obtenidos para las penicilinas estudiadas.

TABLA LVIII

Feneticilina K $c = 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ DMSO $c = 30\% \text{ v/v}$ Temp. = 37°C pH 6,5				
Tiempo en minutos	30	60	90	120
% de Feneticilina activa	100	100	99,5	99

TABLA LIX

Oxacilina Na $c = 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ DMSO $c = 30\% \text{ v/v}$ Temp. = 37°C pH 6,6				
Tiempo en minutos	30	60	90	120
% de Oxacilina Na activa.	100	100	100	99,5

V. DISCUSION

Las penicilinas semisintéticas de las dos series estudiadas por nosotros poseen, en general, una débil actividad hemolítica sobre los eritrocitos de conejo «in vitro». En un intento de relacionar su estructura química con el poder hemolítico y antibacteriano, hemos observado que respecto al primero de ellos la actividad citotóxica de las α -aril-oxialquil-penicilinas no presenta variación alguna con la longitud de la cadena alquílica del radical unido al 6-amino-penicilánico.

Las concentraciones mínimas inhibitorias (c.m.i.) determinadas frente a *S. aureus* 3.055, tomadas del «Antimicrobial Agents and Chemotherapy»,⁶⁵ se recogen a continuación:

Organismo	Penicilina V K	d,l- α -fenoxi- etilpenicilina (Feneticilina)	d,l- α -fenoxi- propilpenicilina (Propicilina)
<i>S. aureus</i> 3055	0,0312 a)	0,0312 a)	0,0312 a)

a) c.m.i. en $\mu\text{gr/ml}$

Estos resultados indican que el poder antimicrobiano frente a este germen, al igual que ocurría con el poder hemolítico, no se encuentra afectado por la longitud de la cadena. El efecto de la longitud de la cadena alquílica sobre las actividades hemolíticas y antibacterianas se compara en la gráfica 22 para los tres primeros términos de esta serie, representándose en ordenadas los logaritmos de la concentración molar que causa justamente hemólisis total y de la concentración mínima inhibitoria (c.m.i.) expresada en moles/l. frente al número de grupos $-\text{CH}_2-$ en la cadena lateral del radical unido al 6-amino-penicilánico.

En cuanto a los diastereoisómeros de la Feneticilina se refiere, los valores de la c.m.i. frente a *S. aureus* 3.055, tomados de la misma obra⁶⁵ son 0,0312 y 0,624 $\mu\text{g/ml}$ para la l- α -fenoxietilpenicilina y d- α -fenoxietilpenicilina, respectivamente, lo que parece indicar que la posición del radical CH_3 en el carbono asimétrico afecta a sus propiedades antibacterianas y sólo en grado de matiz a sus actividades hemolíticas.

En la serie de las isoxazoil-penicilinas, la actividad hemolítica se incrementa con el aumento del número de cloros sustituidos en el grupo bencilo del radical unido al 6-APA, observándose una variación similar en los datos microbiológicos al comparar los anteriores con las c.m.i. para los tres primeros términos de esta serie. Los valores de las c.m.i. determinados por nosotros frente a *S. aureus* 209P se recogen a continuación:

Organismo	Oxacilina Na	Cloxacilina Na	2.6-Dicloxacilina Na
<i>S. aureus</i> 209P	1,0 a)	0,75 a)	0,50 a)

a) c.m.i. en $\mu\text{gr/ml}$.

La gráfica 23 denota una correlación de los resultados de las actividades hemolíticas y microbiológicas de los tres primeros términos de esta serie, observándose que los valores de las primeras están muy por encima de las concentraciones suministradas para ser bactericidas.

En el modo de acción de estos compuestos se ha observado, con carácter general, que existe una disminución en el número de células hemolizadas a concentraciones más elevadas de sangre; este decrecimiento en la actividad puede ser atribuido, probablemente, a la inactivación parcial de las penicilinas por su «binding» al suero y/o a la membrana celular. El hecho de que en algunos experimentos hayamos trabajado, incidentalmente, con glóbulos rojos lavados y empaquetados, siempre en las mismas condiciones, y se haya encontrado una hemólisis mayor que en presencia del suero, nos hace pensar que hay una participación importante del primer fenómeno. Para el segundo caso, podría admitirse que los fosfolípidos de las membranas tuviesen lugares adecuados para su interacción con las penicilinas del medio, hecho generalmente aceptado para explicar la acción bactericida de compuestos de amonio cuaternario.²²

Aunque las hipótesis para aclarar el mecanismo de la hemólisis puedan aplicarse a las dos series de penicilinas semisintéticas estudiadas, las diferencias en las concentraciones críticas que causan hemólisis total, especialmente significativas al considerar los antibióticos cloro-sustituidos frente al resto de las penicilinas, puede atribuirse a la capacidad de los compuestos halogenados para atravesar más rápidamente la barrera lipídica de la membrana del hematíe.

En este estudio, el orden de las actividades hemolíticas de las penicilinas de ambas series es, como se ve, correlativo al de sus actividades antibacterianas, aunque las concentraciones bacteriolíticas de las mismas sean mucho menores que las correspondientes concentraciones hemolíticas.

Los valores de «i», determinados por el método hemolítico, dependen parcialmente de las propiedades de la sustancia para la que se determina dicho valor y, parcialmente, de la permeabilidad del eritrocito de las sustancias empleadas. El empleo de ClNa como patrón de referencia elimina cualquier dificultad de reproductividad de los factores biológicos implicados, particularmente la variable fragilidad del eritrocito que aparece

con el empleo de distintos donadores. Esta variación en los valores de «i», obtenidos a partir de sangre de diferentes conejos de una misma raza, fue de $\pm 3\%$.

Como es sabido, en los cálculos de disoluciones isotónicas se supone que el valor de «i» es el mismo que el número de iones en que se disocia el compuesto. HUSA y ROSSI⁶⁴ han demostrado que el error cometido con esta suposición está dentro de los límites permisibles del trabajo experimental, con tal que la concentración de soluto no sobrepase el valor 0,1 M.

El valor de «i» de distintos solutos se determina, frecuentemente, a partir del punto de congelación o de otra propiedad coligativa de la disolución. Del valor medio de descenso del punto de congelación, para una serie de experimentos, se calcula el valor de «i» mediante la siguiente expresión:

$$\Delta T_f = K_f \cdot i \cdot m$$

donde T_f es el cambio experimentado en el punto de congelación de agua por adición de soluto, K_f es la constante crioscópica molar del agua (1,86), «i» el factor de Van't Hoff, y m la molalidad de la disolución. Sin embargo, los valores de «i» obtenidos exclusivamente por estos métodos dan lugar a una serie de problemas, debido a que alguno de los solutos ensayados pueda pasar con facilidad a través de ciertas membranas, de tal manera que una disolución que tiene un valor de «i», en principio correcto, puede ser inadecuada en la prevención de la hemólisis. Las disoluciones que tienen la misma presión osmótica, basada en la medida de los puntos de congelación o de otra propiedad coligativa, se denominan «isotónicas»; sin embargo, la práctica aconseja denominarlas «isosmóticas» y reservar la denominación de «isotónicas» para las disoluciones que tienen igual presión osmótica con referencia a una membrana plasmática particular, por ejemplo, el eritrocito.

Basándonos en los cálculos de las disoluciones «standard» de ClNa, las cuales tienen un valor de coeficiente de Van't Hoff «i» igual a 1,86, puede esperarse que para las penicilinas correspondientes a las dos series estudiadas, las cuales se encuentran en su forma salina al pH fisiológico, deberían tener un valor de «i» muy próximo a 3,72 ($2 \times 1,86$), si la disociación de estas sales fuera completa, tal como es la del ClNa.

En la serie de las α -aril-oxialquil-penicilinas, los resultados obtenidos nos dan valores de «i» hemolíticos superiores a los que deberían esperarse. Sin embargo, el hecho de que sean próximos entre sí parece indicar que son independientes de la naturaleza del anión y, por otra parte, claramente indiferentes a cualquier acción celular. Este comportamiento puede ser debido a varias razones: los ácidos penicilínicos son ácidos

orgánicos, $pK_a = 2,7-2,9$, y, como tales, son insolubles en las grasas. En disolución, los iones están fuertemente hidratados, debido al grupo carboxilo polar, por lo que difundirán más lentamente, atravesando los poros con mayor dificultad. Esta falta de propiedades «hidrotrópicas» puede justificar los valores de «i» más altos que el valor teórico para esta serie de penicilinas, aunque se trate de permeabilidad de aniones monovalentes.

En la serie de las isoxazoil-penicilinas, los valores del coeficiente «i» hemolítico encontrados, varían ligeramente con la naturaleza del radical unido al 6-APA, observándose una disminución del valor medio del coeficiente con el aumento del número de átomos de cloro de la cadena lateral. Puesto que el grupo ionizable en disolución es el mismo que en las α -aril-oxialquil-penicilinas, parece que las ligeras diferencias observadas en los coeficientes hemolíticos, en esta serie, pueden provenir de un efecto correlativo entre la cloro-sustitución en la cadena lateral de las isoxazoil-penicilinas y su facilidad para atravesar la membrana celular, fenómeno, por otra parte, observado en el estudio de la actividad hemolítica de las mismas en disoluciones salinas. Los fines del trabajo restringen el cálculo de los coeficientes isotónicos al método hemolítico, aunque estimamos de considerable interés la comparación de los resultados encontrados por este procedimiento con los que pudieran obtenerse a partir de cualquier otra propiedad coligativa que no impliquen el empleo de una biomembrana.

Los polietilenglicoles 600 y 1.540, utilizados como solutos protectores a lo largo de nuestros experimentos, han sido elegidos con arreglo al siguiente criterio: se conocen los valores de «i» para el ClNa en disoluciones de PEG-200 y los valores del coeficiente isotónico son, en todos los casos, menores de 1,86.⁵⁹ Estos valores de «i» más bajos indican que el PEG-200 no ofrece protección a los glóbulos rojos frente a la hemólisis osmótica.

Se han encontrado valores de «i» ligeramente más elevados para el ClNa en disolución de PEG-300, lo que indica que este soluto contribuye a la tonicidad de las disoluciones acuosas.

Cuando los valores del coeficiente isotónico se calculan para el PEG-400 y PEG-600, se ha encontrado que dicho valor es mayor en el caso del PEG-600, pero a ambos se les puede considerar que tienen capacidad para proteger a los eritrocitos de la hemólisis osmótica. Es posible establecer entre los PEG líquidos un orden de protección de eritrocitos de conejo frente a la hemólisis, siendo $200 < 300 < 400 < 600$. La capacidad de los PEG para contribuir a la tonicidad de las disoluciones depende de su peso molecular, lo que explica, en cierto modo, que los de bajo peso molecular tengan mayor posibilidad de atravesar la membrana del glóbulo rojo disminuyendo, a veces ostensiblemente, la concentración efectiva de las disoluciones extracelulares.

Al-PEG-600 podemos considerarle, pues, como un polímero no difundible a través de la membrana celular; esta cualidad y el hecho de que sea líquido a la temperatura ambiente, nos ha inducido a utilizarlo en nuestros experimentos; junto con él se ha empleado el PEG-1.540, polímero sólido en las mismas condiciones.

La hemólisis inducida por las penicilinas ensayadas depende de la concentración de las mismas. Las concentraciones que causan indicios de hemólisis y hemólisis total, así como las diferencias entre estos dos valores experimentales para todas las penicilinas expresados todos en mol l^{-1} , se recogen en la Tabla LX.

TABLA LX

Antibiótico	Concentración que causa indicios hemólisis mol $l^{-1} \cdot 10^{-2}$	Concentración que causa 100 % hemólisis mol $l^{-1} \cdot 10^{-2}$	Diferencia de concentraciones (Δc) mol $l^{-1} \cdot 10^{-2}$
Penicilina V K	2,8	9,6	6,8
Feneticilina K	2,5	9,8	7,3
Propicilina K	2,1	9,5	7,1
Oxacilina Na	1,1	7,8	6,7
Cloxacilina Na	1,0	4,7	3,7
2,6-Dicloxacilina Na	0,2	2,5	2,3 ₅

La reducción progresiva en la respuesta hemolítica por concentraciones crecientes de PEG, tal como se recoge en las gráficas 15 a 18 indican, a primera vista, que las penicilinas interaccionan con los PEG de tal manera que la actividad hemolítica discurre de la misma forma que su interacción con la macromolécula, si ésta tuviera lugar.

Si se supone que los PEG interaccionan con las penicilinas y que la interacción es la única responsable de la disminución de la respuesta hemolítica, la cantidad de macromolécula implicada en la reducción de la hemólisis, desde un 100 % a indicios, tiene una importancia de significado práctico.

En la Tabla LX se recogen las concentraciones de cada antibiótico (c.mol. l^{-1}) que se precisa complejar o con las que el correspondiente PEG debe interaccionar para disminuir la hemólisis del 100 % a indicios.

De acuerdo con las gráficas 15-A, 15-B y 17 las concentraciones de polímero de peso molecular más elevado, PEG-1.540, que inicia la reduc-

ción de la hemólisis inducida por los dos primeros términos de las dos series de penicilinas estudiadas hasta la eliminación de la respuesta hemolítica, son 0,05 equiv. l^{-1} y 0,45 equiv. l^{-1} para la Penicilina VK, y 0,15 equiv. l^{-1} y 0,55 equiv. l^{-1} para la Oxacilina Na, respectivamente. La diferencia, en ambos casos coincidente (0,40 equiv. l^{-1}), expresa la concentración de polímero requerida para interaccionar con $6,8 \cdot 10^{-1}$ de Penicilina VK y con $6,7 \cdot 10^{-2}$ mol l^{-1} de Oxacilina Na, reduciendo la hemólisis inducida por el antibiótico del 100 % a un porcentaje prácticamente nulo. La concentración de 0,40 equiv. l^{-1} , respecto a los dos polímeros, refleja las siguientes concentraciones en mol l^{-1} : PEG-600, $2,5 \cdot 10^{-2}$ mol l^{-1} ; PEG-1.540, $0,82 \cdot 10^{-2}$ mol l^{-1} . Sobre la base de 1 mol, 1 mol de penicilina interaccionaria con 0,36 moles de PEG-600 y con 0,12 moles de PEG-1.540, indicando que los polímeros de peso molecular más elevado y, por lo tanto, con mayor número de grupos óxidos de etileno por molécula, tienen una mayor capacidad de interacción. Aunque esta interacción sería fácilmente puesta de manifiesto por los métodos usuales de ultra-centrifugación, diálisis, etc., no hemos encontrado en la literatura referencia alguna sobre el «binding» de Penicilina a Polietilenglicoles.

Otra posible explicación de la acción inhibitoria de los polietilenglicoles sobre la hemólisis eritrocítica producida por penicilinas pudiera residir en sus propiedades protectoras de la membrana del hematíe, debido a la facilidad con que el grupo polioxi-etilénico de las macromoléculas, en general, forma puentes de hidrógeno en los grupos polares de las proteínas de la membrana, sin necesidad de penetrar en la célula.

Dimetil Sulfoxido.

Las curvas hemolíticas individuales para las dos penicilinas estudiadas, gráfica veinte, no solamente indican la potencia hemolítica relativa de estos agentes antibacterianos sino que suministran el medio por el que pueden escogerse las concentraciones adecuadas de estos antibióticos en el estudio de una posible combinación con el DMSO para determinar la influencia de este último agente químico en la hemólisis de los eritrocitos de conejo.

En los experimentos realizados con DMSO para determinar si es un soluto promotor o inhibidor del grado de hemólisis comparativamente con la solución salina control 0,093 M, se ha escogido la concentración de antibiótico que causa un grado de hemólisis intermedio, aproximadamente el 50 %. Se ha encontrado, en cada momento, que la presencia de cantidades de DMSO, hasta aproximadamente de un 25 % v/v, causan una disminución progresiva del grado de hemólisis para cada penicilina estu-

diada, con un tiempo de incubación de 45 minutos para cada experimento. Este tipo de experimentos se amplió con cantidades de antibióticos que causan un 10 y un 100 % de hemólisis, de tal manera que la influencia del DMSO sobre la reducción de la hemólisis pueda ser seguida durante un tiempo de operación más largo en el segundo caso.

Ha sido previamente demostrado por nosotros que el DMSO causa hemólisis total a todos los niveles de concentración en disolución acuosa pero, cuando se encuentra en presencia de CINa 0,093 M la hemólisis no tiene lugar hasta niveles superiores al 30 % v/v de DMSO en la mezcla. Las curvas obtenidas para este último caso demuestran una depresión óptima a tres concentraciones distintas del antibiótico correspondiente (las que causan el 10 %, el 50 % y el 100 % de hemólisis), encontrándose el mínimo en las curvas experimentales, a valores aproximados del 25 % v/v de DMSO cuando las concentraciones de antibiótico elegidas corresponden a las que causan el 50 % y el 100 % de hemólisis. Este valor parece coincidir con el mínimo del diagrama temperatura $^{\circ}\text{C}$ -fracción molar de DMSO, encontrando por HAVEMEYER⁶¹ en la región del eutéctico. La concentración molar de DMSO encontrada por este autor correspondería a una relación de 2 moles de agua a 1 mol de DMSO, proponiendo que podría formarse un complejo de relación 2 :1 entre el agua y el DMSO a través de puentes de hidrógeno, más fuerte que el que formarían entre sí 2 moléculas de agua. Sin embargo, nuestros valores, si bien meramente indicativos, se aproximan más a la relación 3 :1, dada por SCHOTT.⁶² De cualquier manera, parece ser que las propiedades crioprotectoras del DMSO están relacionadas con los efectos inhibidores del compuesto en la hemólisis eritrocítica a través de su peculiar modo de acción.

La naturaleza higroscópica del DMSO juega un papel importante por su capacidad de atravesar las membranas biológicas y quizás para modificar la configuración de las proteínas de la membrana, siendo capaz, a causa de su tamaño molecular comparativamente pequeño, de penetrar a través de ciertas subunidades interfaciales proteicas, más rápidamente que otros disolventes de mayor tamaño molecular.

RAMMLER y ZAFFARONI⁶³ indican que la capacidad del DMSO, en elevadas concentraciones, para atravesar la barrera proteica cuya integridad depende de la fijación de agua, es el resultado de cambios de configuración reversibles de estas proteínas debido a la sustitución del agua por DMSO.

Puesto que el principal componente de la célula es el agua y la forma natural de los biopolímeros, tales como las proteínas, los polisacáridos y los ácidos nucleicos, por ejemplo, están rodeados por capas de agua, envoltura de hidratación, nos permite sugerir que por esta condición el DMSO penetra en la célula, manteniéndose en su interior. La sustitución o la retirada de la envoltura de hidratación conducirá a una modificación

de la configuración de los biopolímeros y, por consiguiente, de las células. En muchas ocasiones se ha comprobado que las células así afectadas no se alteran de manera permanente, por lo que el proceso reversible se puede considerar producido ya sea como difusión o transporte activo de mayor cantidad de DMSO, o por la retirada gradual de la proteína ligada al DMSO por unión competitiva con el agua celular, RAMMLER y ZAFFARONI.⁶³

Estos mecanismos de acción son perfectamente compatibles con los resultados obtenidos en presencia de las penicilinas ensayadas. Los datos de la gráfica veinte demuestran, de forma convincente, que, aunque el DMSO es efectivo en la disminución del grado de hemólisis producida por concentraciones bajas del antibiótico correspondiente, puede llegar a perder la efectividad en presencia de concentraciones de antibiótico de gran potencia hemolítica. La diferencia en la concentración de penicilina ensayada requerida para causar la hemólisis total, comparada con la cantidad necesaria para causar indicios de hemólisis en presencia de DMSO, no parece indicar que el empleo de concentraciones mayores de DMSO deban ir asociadas a una mayor facilidad en la formación del complejo antibiótico-DMSO; por lo que los resultados hallados permiten sugerir que el mecanismo de acción del DMSO en la prevención de la hemólisis depende de su acción sobre la célula y no de un mecanismo de interacción extracelular DMSO-antibiótico. Esta hipótesis está confirmada por los estudios espectrales, donde los datos obtenidos nos permiten sugerir que entre el DMSO y las penicilinas correspondientes a las dos series estudiadas no existe la formación del complejo mencionado, asegurándonos mediante los estudios de degradación que la actividad de la penicilina presente era superior al 98 % en las condiciones de consecución del espectro. Sin embargo, pensamos que deben realizarse estudios más complejos antes de excluir, de manera categórica, la formación del complejo.

En conclusión, podemos decir que el DMSO interfiere la acción hemolítica del antibiótico a través de una acción directa sobre el eritrocito, por alteración de las barreras de permeabilidad de su membrana, siendo muy poco probable que el efecto inhibidor sea debido a la interacción química con las penicilinas del medio.

VI. CONCLUSIONES

1.^a.—Se ha puesto a punto una técnica experimental para la medida cuantitativa de la hemólisis eritrocítica. Esta técnica ha sido contrastada mediante la Ley de Lambert-Beer, siendo muy satisfactoria la precisión conseguida.

2.^a.—Respecto a los valores medios de la dosis tóxica (1,5 gr/kg de peso), las actividades hemolíticas de las penicilinas estudiadas en nuestras condiciones experimentales, pueden considerarse nulas.

3.^a.—De acuerdo con nuestras condiciones experimentales, se observa una correlación entre las actividades hemolítica y antibacteriana en las dos series de penicilinas estudiadas, no encontrándose en la serie α -aril-oxialquil-penicilina influencia alguna con la variación en la longitud de la cadena alquílica del radical unido al ácido 6-amino-penicilánico.

4.^a.—Se ha encontrado una relación lineal entre los logaritmos de las concentraciones hemolítica y antibacteriana, y el número de átomos de cloro en la molécula para los tres primeros términos de la serie de las isoxazoil-penicilinas. Ambas actividades vienen afectadas por la cloro-sustitución en el grupo bencilo del radical unido al ácido 6-amino-penicilánico.

5.^a.—Se considera un comportamiento anómalo para los diastereoisómeros de la d,l- α -fenoxietilpenicilina (Feneticilina), encontrándose una discrepancia entre sus propiedades químicas, sus actividades antibacterianas y hemolíticas.

6.^a.—Se han determinado los valores del coeficiente hemolítico «i» para los tres primeros términos de las dos series de penicilinas estudiadas. El hecho general de que éstos excedan de 2,0 es, aparentemente, debido a un cambio de permeabilidad de la membrana corpuscular resultante de la pérdida de electrolito desde el interior de la célula. La presencia de ClNa 0,2 % p/v restablece la permeabilidad normal para todas las penicilinas estudiadas.

7.^a.—Se proponen como posibles mecanismos de la acción inhibidora de la hemólisis, producida por las penicilinas estudiadas en presencia de polietilenglicoles 600 y 1.540, la protección de la membrana conferida por la forma general de actuar estas macromoléculas y/o la interacción entre las penicilinas y los polietilenglicoles, detectadas por el método hemolítico.

8.^a.—El dimetil-sulfóxido interfiere con la actividad hemolítica de las penicilinas estudiadas, a través de una acción directa sobre el eritrocito por alteración de sus barreras de permeabilidad. El grado de interferencia depende de las concentraciones de ambos, el dimetil-sulfóxido y la penicilina, y también del tiempo de exposición a estos agentes químicos.

RESUMEN

Ha sido estudiada la actividad hemolítica de penicilinas semisintéticas correspondientes a las series α -aril-oxialquil e isoxazoil-penicilinas, sobre eritrocitos de conejo «in vitro» en presencia de Cloruro Sódico 0,093 M. La potencia hemolítica de las α -aril-oxialquil-penicilinas es,

prácticamente, la misma para los tres primeros términos de la serie, aumentando en las isoxazoil-penicilinas con el número de átomos cloro-sustituídos en el grupo bencilo del radical unido al ácido 6-amino-penicilánico. Asimismo se han determinado los valores de los coeficientes hemolíticos de «i» para los tres primeros términos de las penicilinas estudiadas y la influencia de dos solutos protectores, Polietilenglicol (PEG) y Dimetil-Sulfóxido (DMSO), en la inhibición de la hemólisis. Los datos obtenidos indican como posibles mecanismos de la acción inhibidora de los (PEG), la protección de la membrana conferida por la forma de actuar estas macromoléculas y/o la interacción entre las penicilinas y los (PEG) detectadas por el método hemolítico. El (DMSO) interfiere a través de una acción directa sobre el eritrocito por alteración de sus barreras de permeabilidad. El grado de interferencia depende de las concentraciones de ambos, (DMSO) y penicilina, y del tiempo de exposición a este agente químico.

RESUME

On a étudié l'activité hémostatique des pénicillines demi-synthétiques correspondantes aux séries α -aryl-oxyalkyl et isoxazol-pénicillines sur des érythrocytes de lapin «in vitro» en présence de chlorure de sodium 0,093M. L'activité hémostatique des α -aryl-oxyalkyl-pénicillines est, pratiquement, la même pour les trois premiers termes de la série, et elle augmente dans les isoxazol-pénicillines selon le nombre d'atomes chlore-sustitués dans le groupe benzyle du radical uni à l'acide 6-aminopénicillanique.

On a déterminé également les valeurs des coefficients hémostatiques de «i» pour les trois premiers termes des pénicillines étudiées et l'influence de deux solutes protecteurs, le Polyéthylenglycol (PEG) et le Diméthyl-Sulfoxyde (DMSO), sur l'inhibition de l'hémolyse. Les données obtenues indiquent que la protection de la membrane conférée par la forme d'action de ces macromolécules et/ou l'interaction entre la pénicilline et les PEG détectée par la méthode hémostatique sont de possibles mécanismes de l'action inhibitrice des PEG. Le DMSO interfère à travers une action directe sur l'érythrocyte par altération de ses barrières de perméabilité. Le degré d'interférence dépend des concentrations du DMSO et de la pénicilline, et du temps d'exposition à cet agent chimique.

SUMMARY

We have studied the hemolytic activity of semi-synthetic penicillins corresponding to α -aryl-oxyalkyl and isoxazol-penicillins, on erythrocytes

of rabbit «in vitro» in presence of sodium chloride 0,093M. The hemolytic activity of α -aryl-oxyalkyl-penicillins is practically the same in the three first terms of the series and it increases in the isoxazol-penicillins according to the number of atoms chloro-substituted in the benzyl group of the radical close to 6-amino-penicillanic acid.

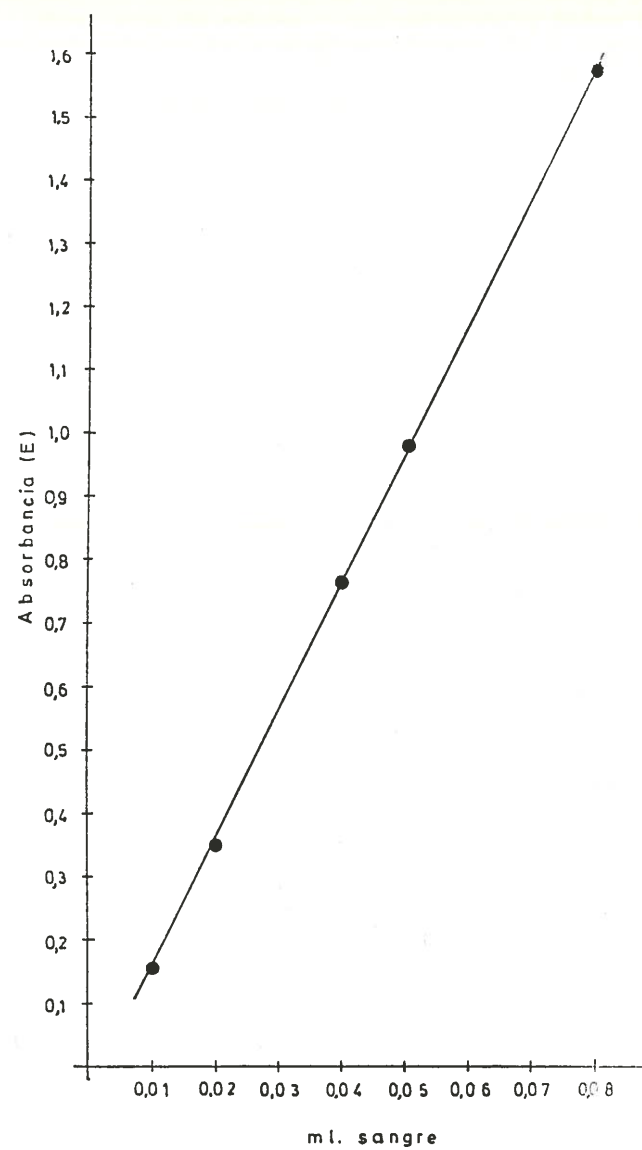
We have also determined the values of the hemolytic coefficients of «i» for the three first terms of the penicillins studied and the influence of two protective solutes, Polyethylenglycol (PEG) and Dimethyl-Sulfoxide (DMSO) on the inhibition of hemolysis.

The data obtained show the protection of the membrane conferred by the way these macromolecules act and/or the interaction between the penicillins and the Polyethylenglycols detected by hemolytic method as possible mechanisms of the inhibitory action of Polyethylenglycols (PEG). Dimethyl-Sulfoxide interferes through a direct action on the erythrocyte by altering its permeability barriers. The interference grade depends on the concentration of both, Dimethyl-Sulfoxide and Penicillin, and on the time of exposition against this chemical agent.

BIBLIOGRAFIA

1. BERG, H. C., DIAMOND, J. M. y MARFEY, P. S., (1965).—*Mass. Sciences*, 150, 64.
2. LUCY, J. A., (1964).—*J. Theoret. Biol.*, 7, 360.
3. DEULOFEU, V., (1967).—*Química Biológica*, 9.^a ed. Editorial Ateneo, Buenos Aires, 353.
4. NACHMAN, A., (1963).—y col., *Farmaes.* 59: 311.
5. Editorial de *Farmaes.* (1958).—88, 617.
6. STRUMIA, P. V. y RAYMOND, F. D., (1962).—*Arch. Int. Med.*, 109, 603.
7. BUSTINZA, F., (1945).—*La penicilina*. Editorial Plus Ultra, 3.^a ed. 95.
8. LOMA de la, V., (1949).—*Revta. clin. esp.*, 32, 372.
9. ANSEL, H. C. y CADWALLADER, D. E., (1964).—*J. Pharm. Sci.*, 53, 169.
10. GISVOL, O., (1949).—*Organic Chemistry in Pharmacy*, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., 147.
11. JOSWICK, H. L. y GERHARDT, P., (1960).—*Bact. Proc.*, 60, 100.
12. LACHMAN, L., (1962).—y col., *J. Pharm. Sci.* 51, 224.
13. PETHICA, B. A. y SCHULMAN, J. H., (1953).—*Biochem. J.*, 53, 177.
14. LAWRENCE, C. A., (1957).—*Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization*, Lea and Febiger, Philadelphia, Pa., 590.
15. SAITO, G., (1958).—*Chem. Abstr.*, 52, 9241.
16. BENESCH, R. E., y BENESCH, R., (1954).—*Arch. Biochem. Biophys.*, 48, 38.
17. BREWER, J. H., (1957).—*Antiseptics, disinfectants, fungicides and chemical and physical sterilization*, Lea and Febiger, Philadelphia, Pa., 284.
18. GOTTFRIED, N. S., (1962).—*Am. J. Hosp. Pharm.*, 19, 310.
19. CADWALLADER, D. E. y ANSEL, H. C., (1965).—*J. Pharm. Sci.*, 54, 1010.
20. NEWTON, B. A., (1960).—*J. Appl. Bact. Rev.*, 23, 345.
21. GLASSMAN, H., (1918).—*Bact. Rev.*, 12, 105.
22. GILLY, A. y FEW, A. G., (1960).—*J. gen. Microbiol.*, 23, 18.
23. HOTCHKISS, R. D., (1946).—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 46, 479.

24. BURNET, F. M. y LUSH, D., (1940).—*Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, 18, 141.
25. LUND, C. G., PEULICKE NIELSEL, E. y PEDERSEN-BJERGAARD, K., (1947).—*The preparation of solutions isosmotic with blood, tears, and secretions.*, Heineman Medical Book Ltd., London, 16.
26. GRIJNS, G., (1896).—*Pflügers. Arch. ges. Physiol.*, 63, 86. Citado por HOBER, R., (1945).—*Physical Chemistry of Cells and Tissues*. 1st. ed. Blakiston Co., Philadelphia, Pa., 238.
27. DAVSON, H. C. y DANIELLI, J. F., (1943).—*The Permeability of Natural Membranes*, The Macmillan Co., New York.
28. PONDER, E., (1948).—*Hemolysis and Related Phenomena*, Grune and Stratton, New York.
29. ANSEL, H. C. y HUSA, W. J., (1959).—*J. Am. Pharm. Ass.*, 48, 565.
30. ZANOWIAK, P. y HUSA, W. J., (1959).—*J. Am. Pharm. Ass.*, 48, 565.
31. THOMASSON, C. L. y HUSA, W. J., (1958).—*J. Am. Pharm. Ass.*, 47, 711.
32. PISANO, F. D. y KOSTENBAUDER, H. B., (1959).—*J. Am. Pharm. Ass.-Sci. ed.*, 48, 310.
33. ANSEL, H. C., (1965).—*J. Pharm. Sci.*, 54, 1159.
34. GLAUSER, H. C. y TALBOT, T. R., (1956).—*Am. J. med. Sci.*, 231, 75.
35. SLOVITER, H. A., (1958b).—*Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. exp. Biol.*, 17, 313.
36. ANSEL, H. C. y LEAKE, W. F., (1966).—*J. Pharm. Sci.*, 55, 685.
37. RUBIN, L. F. y MATTIS, P. A., (1966).—*Science*, N. Y., 153, 83.
38. ASHWOOD-SMITH, M. J., (1961).—*J. Physiol.*, Lond., 155, 26.
39. HUGGINS, C. E., (1963b).—*Transfusion*, Philadelphia, Pa., 3, 483.
40. PYLE, H. M. y BOYER, H. F., Proc. IXth Congr. Int. Soc. Blood Transf. México (Basel, Karger, 89 - 1964).
41. FOURNEAU, E. y SANDULESCU, D., (1922).—*Bull. Soc. Chim.*, Paris, 4, 988.
42. FREDGA, A. y MATELL, M., (1952).—*Ark. Kemi.*, Stockholm, 4, 325.
43. PERRON, Y. G., (1960).—y col., *Antibióticos A.*, New York, Antibiótica Inc., 107.
44. HAWK, P. B. y OSER, B. L., (1947).—*Química Biológica Práctica*, 12.^a ed. Editorial Interamericana, México, 450.
45. HUNTER, F. T., (1940).—*J. clin. Invest.*, 19, 691.
46. GOUREVITCH, A., (1960).—y col., *Antibiotics A.*, New York, Antibiotica Inc., 111.
47. SETNIKAR, I. y TEMELCOU, O., (1959).—*J. An. Pharm. Ass.*, 48, 628.
48. MAIZELS, M., (1943).—*Q. Jl. exp. Physiol.*, 32, 143.
49. RAPOPORT, S., (1947).—*J. clin. invest.*, 26, 591.
50. MAIZELS y WHITTAKER, N., (1940).—*Lancet*, 1, 590.
51. PLOUVIER, S., (1965).—*Arch. Inst. Pasteur, Madagascar*, 33, 237.
52. WOKES, F., (1936).—*J. Pharm. Pharmacol.*, 9, 455.
53. HUSA, W. J. y ADAMS, J. R., (1944).—*J. Am. Pharm. Ass.*, 33, 329.
54. GROSICKI, T. S. y HUSA, W. S., (1954).—*J. Am. Pharm. Ass.-Sci. ed.*, 43, 632.
55. CADWALLADER, D. E. y HUSA, W. J., (1958).—*J. Am. Pharm. Ass.*, 47, 705.
56. BJERRUM, N., (1907).—*Z. Elektrochem.*, 24, 259. Citado por Taylor, H. S., (1950).—*A Treatise on Physical Chemistry*, 2nd ed., D. Van Nostram Company, Inc., New York, 779.
57. GLASTONE, S., (1950).—*Textbook on Physical Chemistry*, 2nd ed., D. Van Nostrand Company, Inc., New York, 960.
58. HARNED, H. S. y OWEN, B. B., (1958).—*The Physical Chemistry of Electrolyte Solutions*, 3rd ed., Reinhold Publishing Corp., New York, 492.
59. SMITH, B. L. y CADWALLADER, D. E., (1967).—*J. Pharm. Sci.*, 56, 351.
60. ORTENBLAD, B., (1950).—*Acta chem. scand.*, 4, 518.
61. HAVEMEYER, R. M., (1966).—*J. Pharm. Sci.*, 55, 851.
62. SCHOTT, H., (1969).—*J. Pharm. Sci.*, 58, 946.
63. RAMMLER, D. H. y ZAFFARONI, A., (1967).—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 141, 13.
64. HUSA, W. J. y ROSSI, D. A., (1942).—*J. An. Pharm. Ass.*, 31, 270.
65. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, RADAY, New York, 589. (1967).

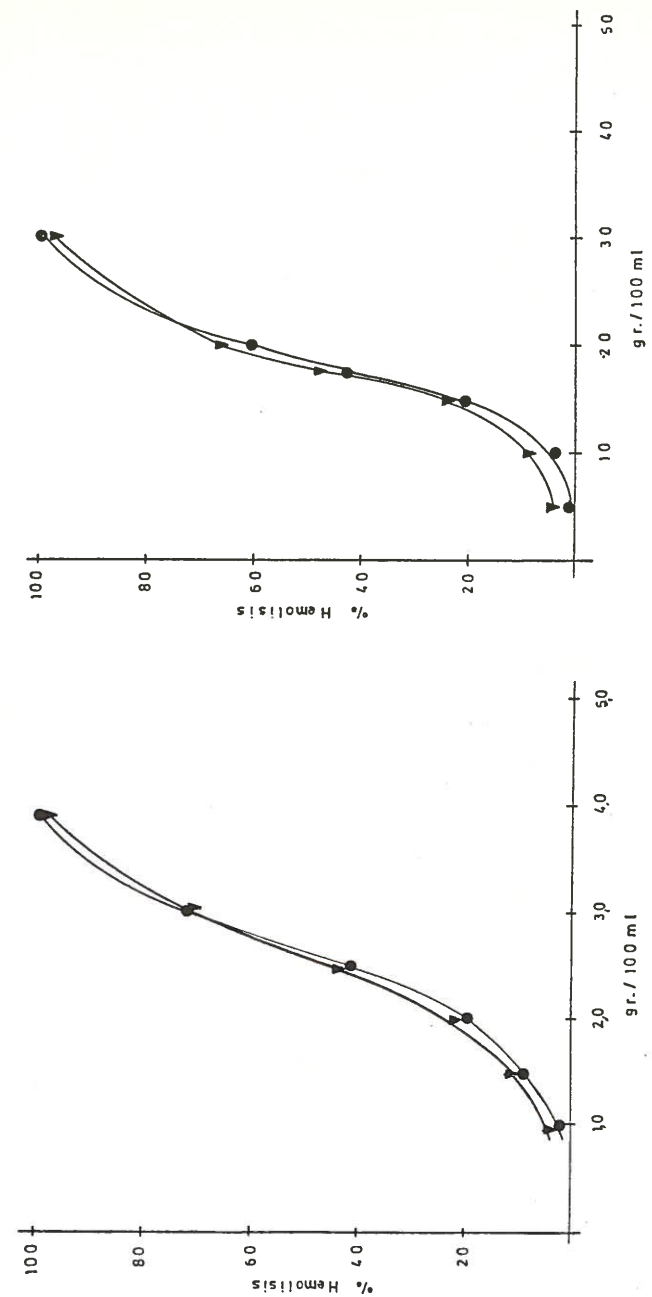


GRAFICA 1

Oxacilina - Na

● Conejo blanco de N. Zelanda
▼ " " comun

Feneticilina - K

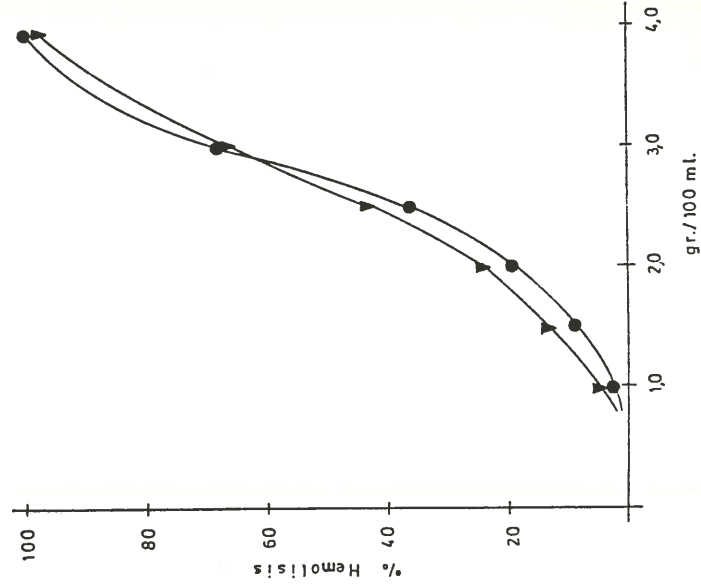
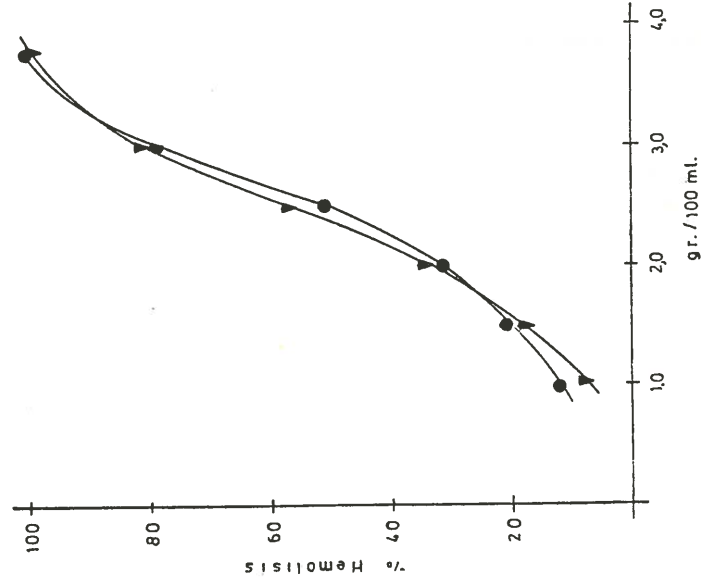


GRAFICA 2

Penicilina V-K

Propicilina - K

● Conejo blanco de N. Zelanda
▼ " comun



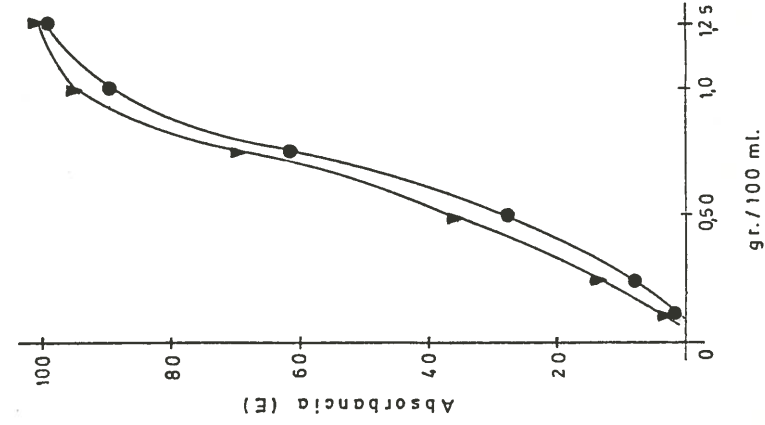
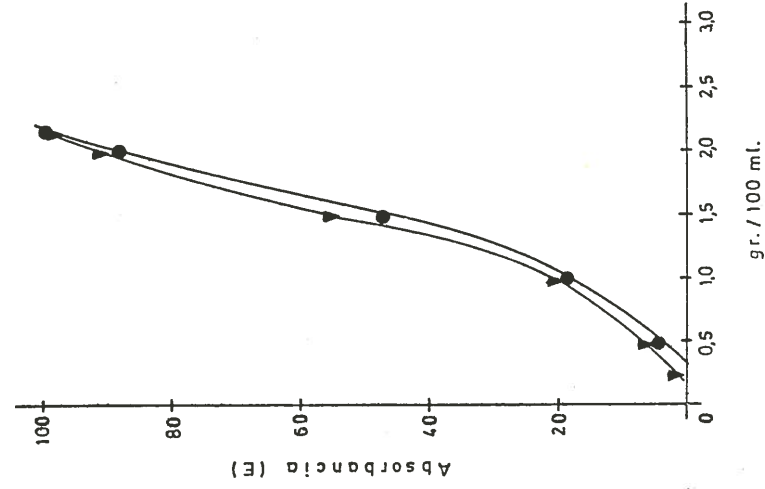
— 148 —

GRAFICA 3

Eloxacilina Na

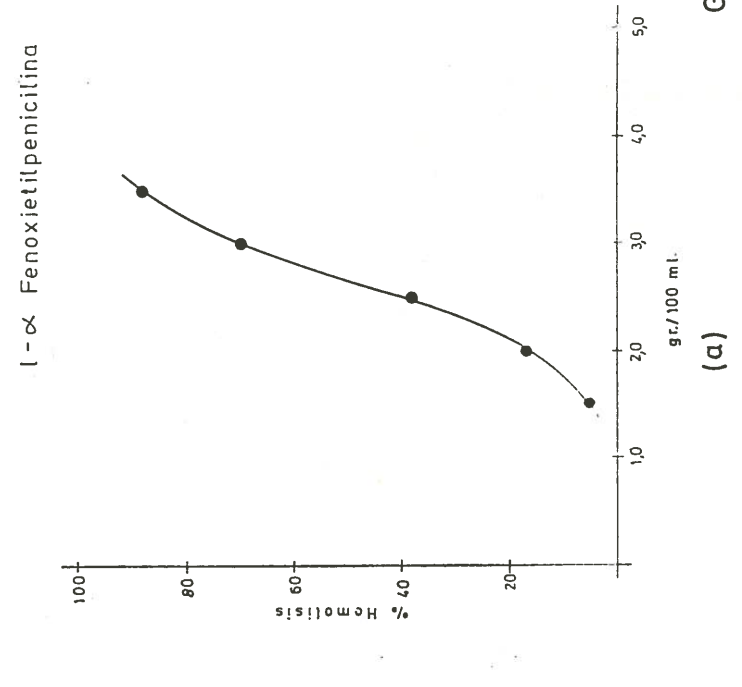
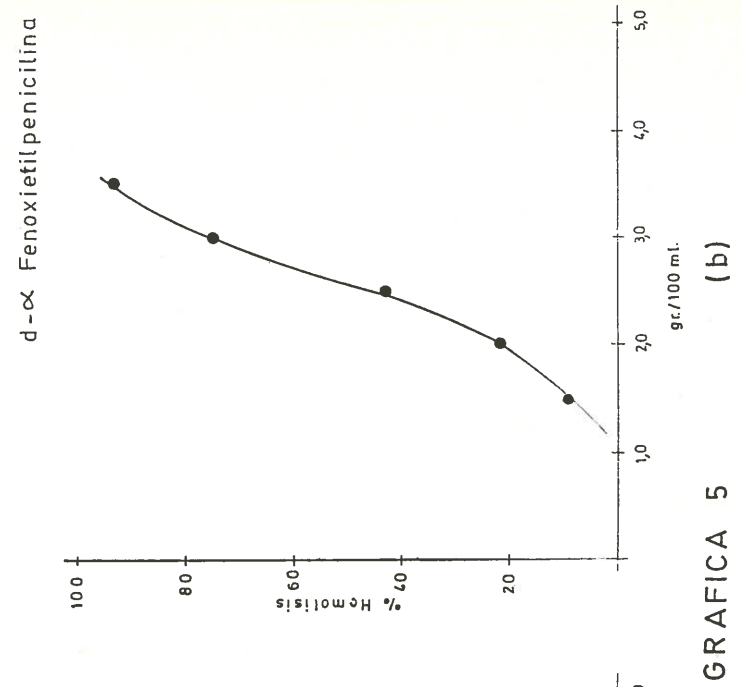
2,6 Dicloxacilina Na

● Conejo blanco de N. Zelanda
▼ " comun

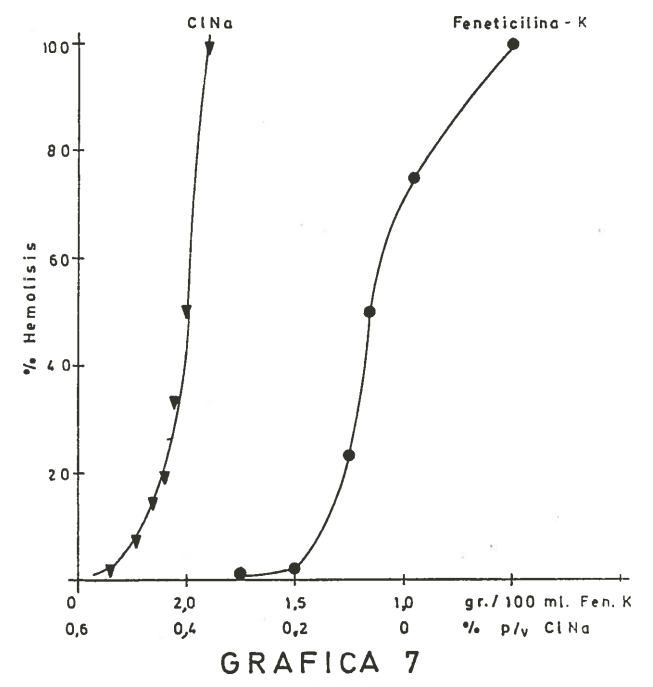
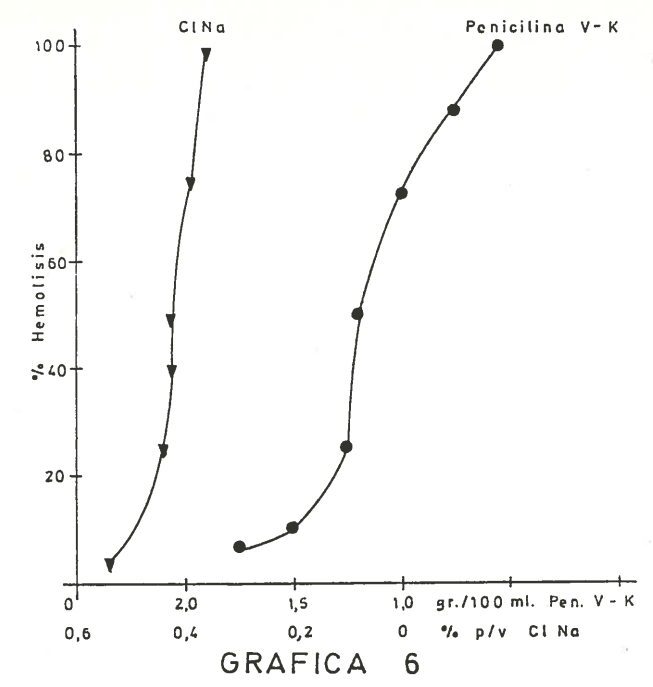


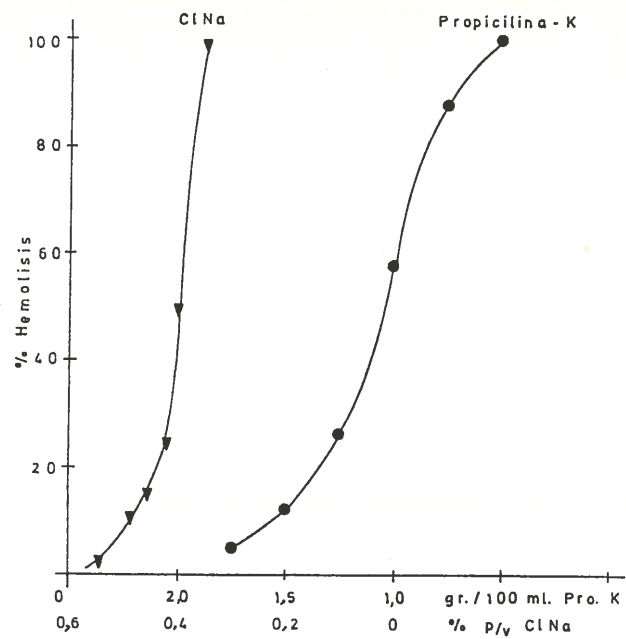
— 149 —

GRAFICA 4

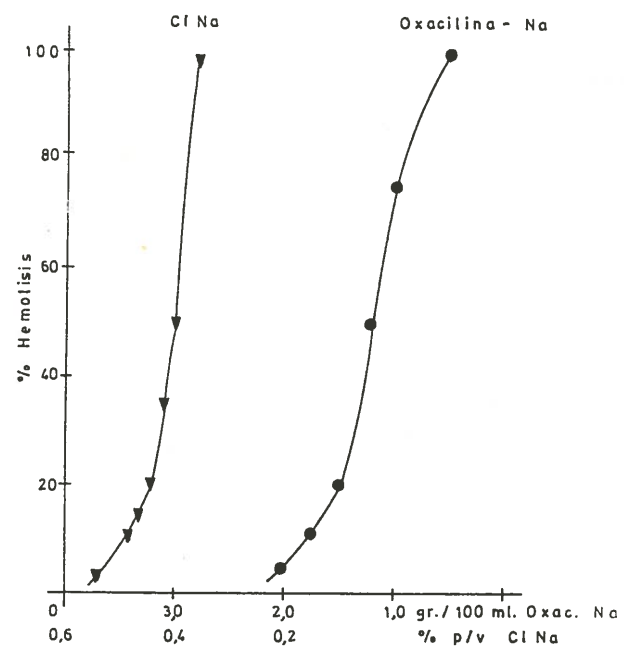


GRAFICA 5

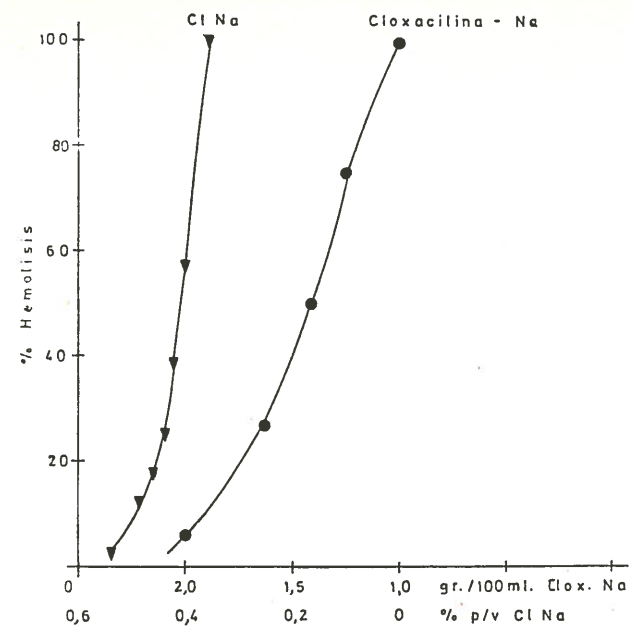




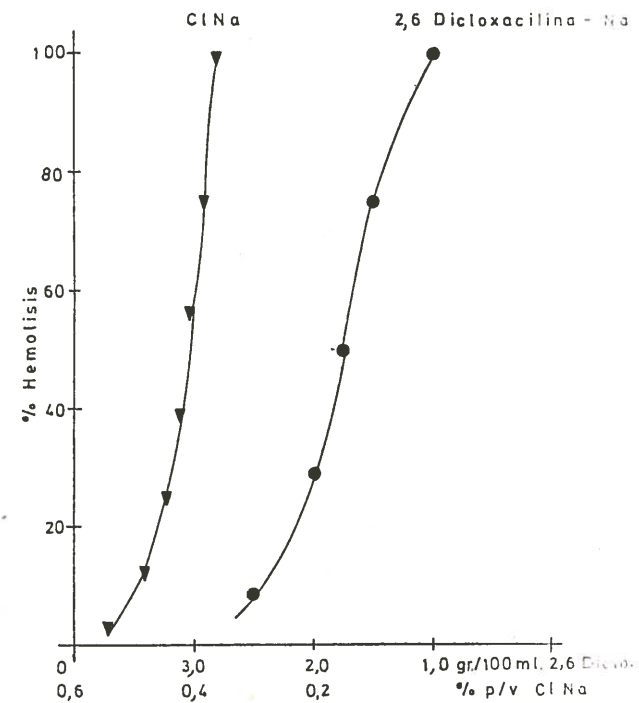
GRAFICA 8



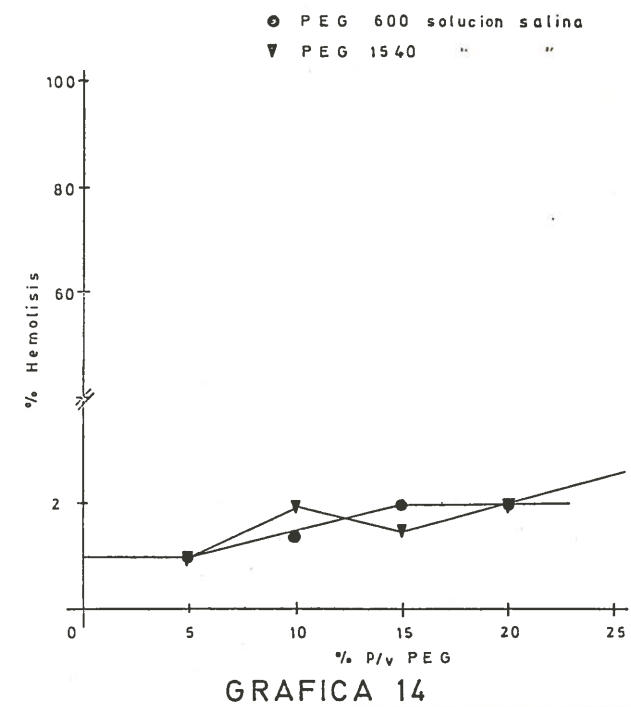
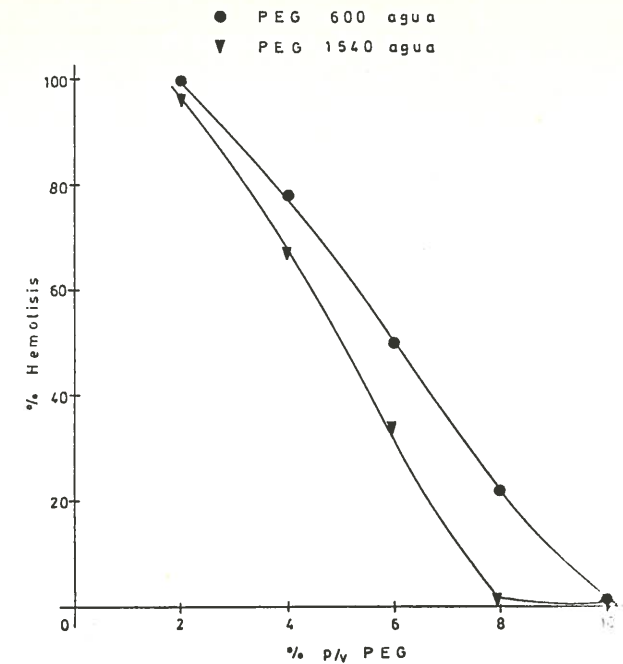
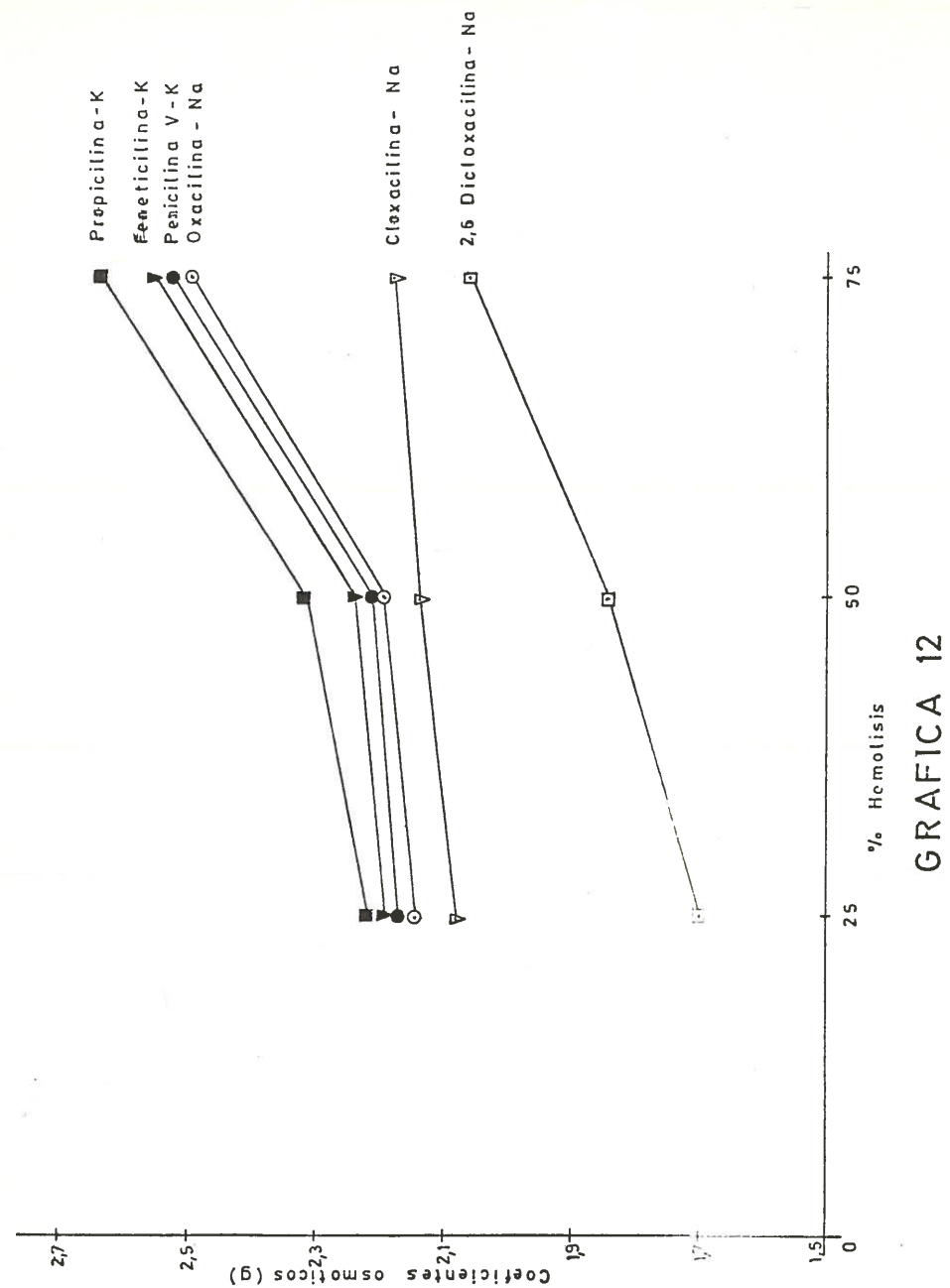
GRAFICA 9

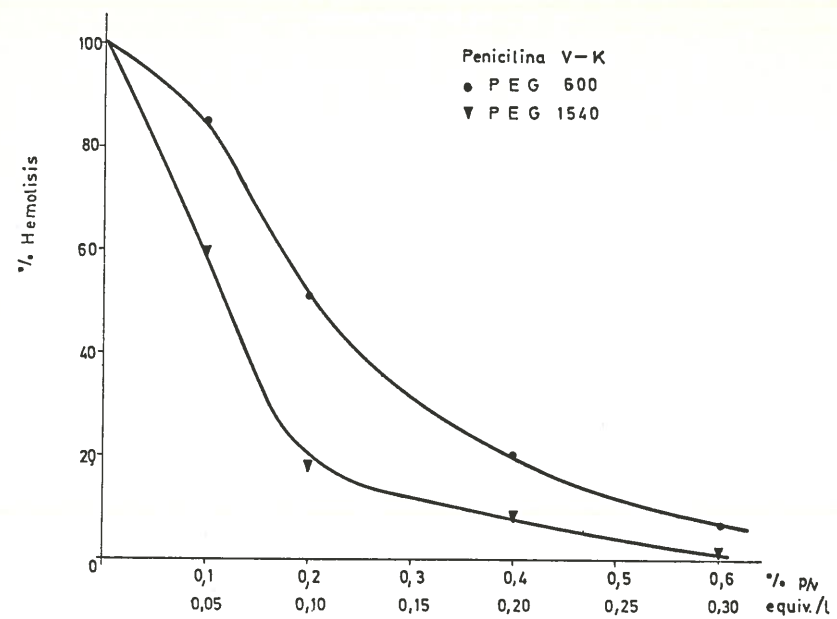


GRAFICA 10

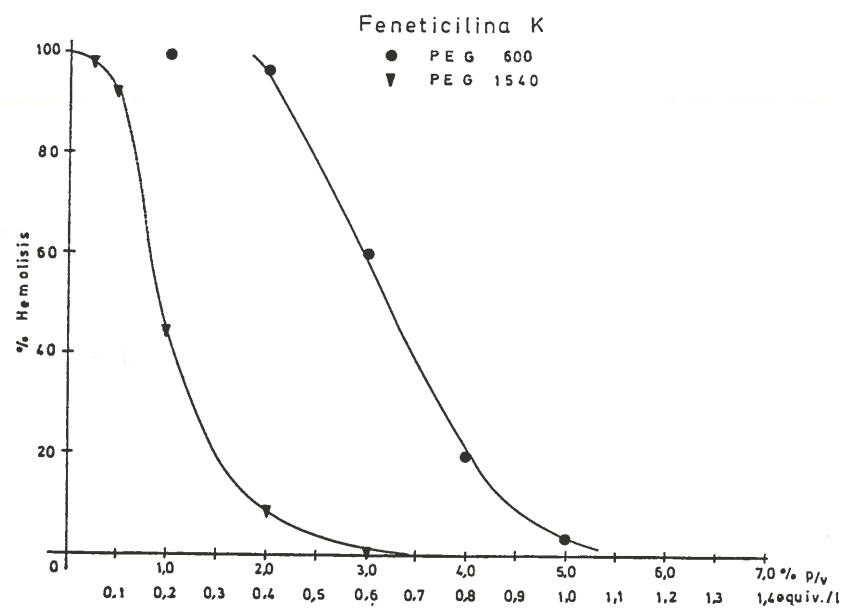


GRAFICA 11

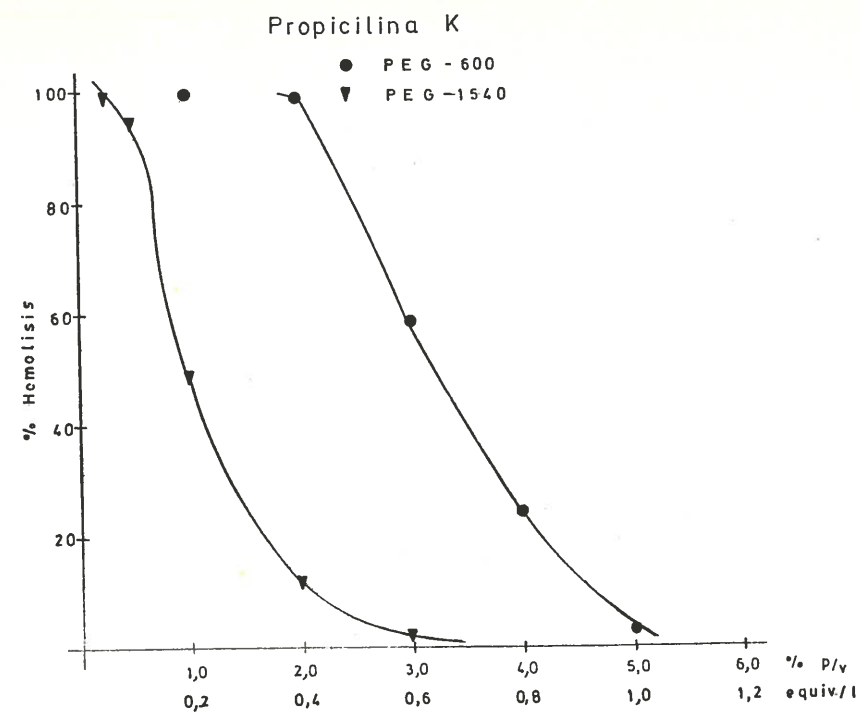




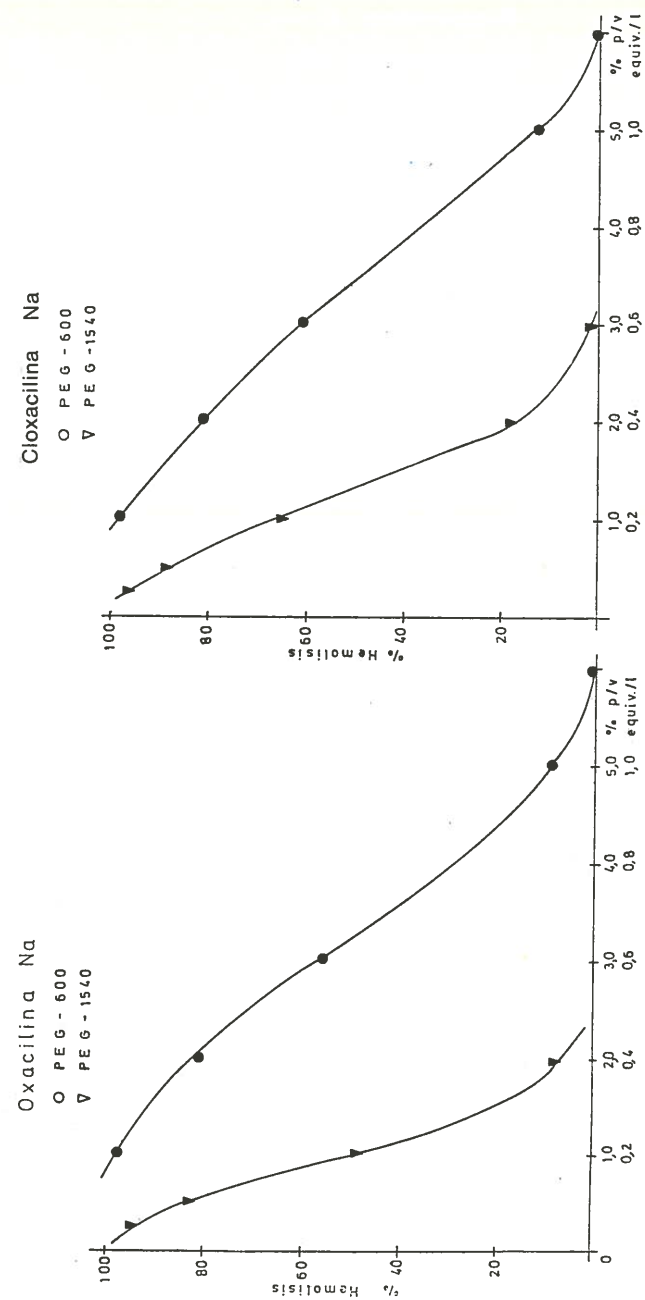
Gráfica 15-A



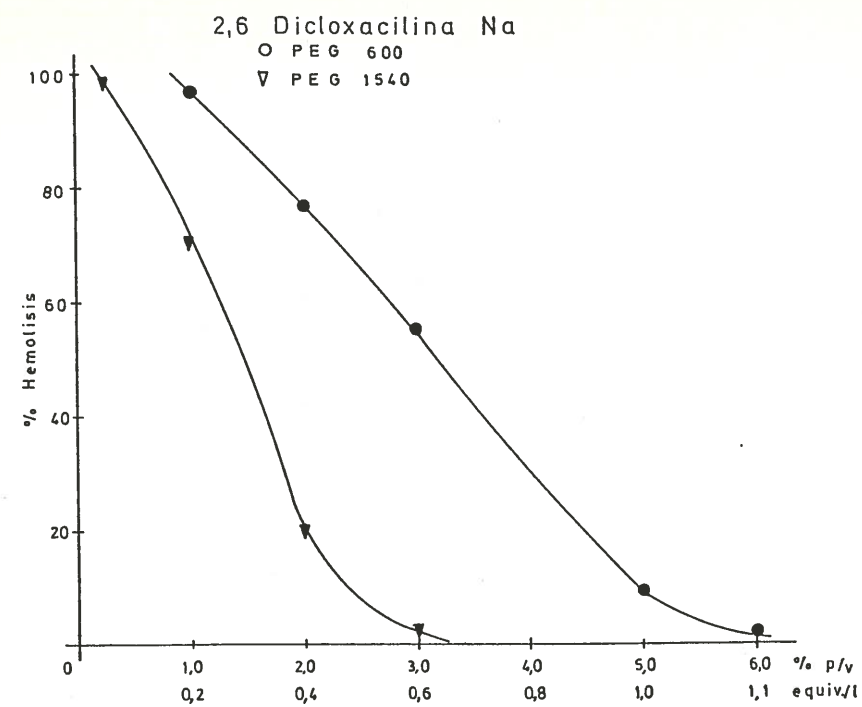
Gráfica 15-B



Gráfica 16

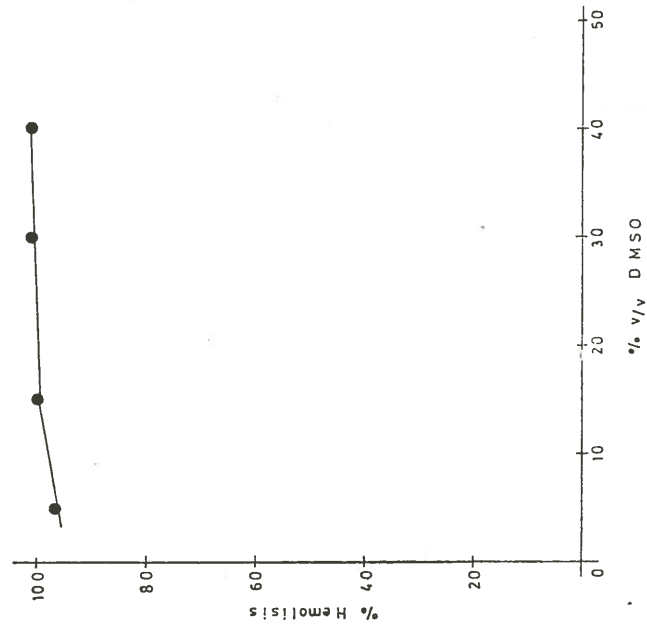


GRAFICA 17

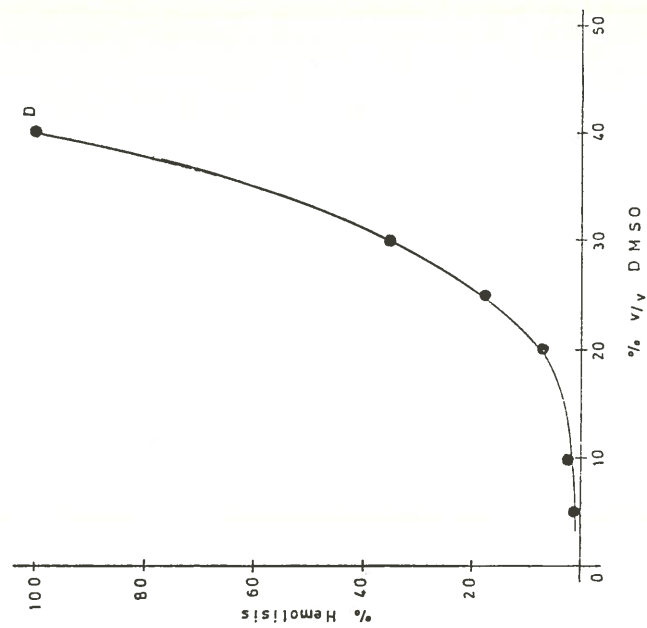


GRAFICA 18

Agua - DMSO

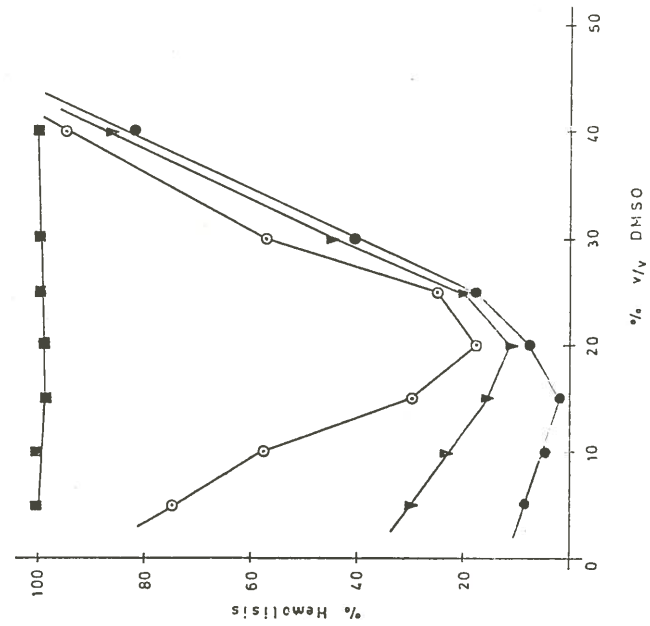


Disolucion salina 0,093 M - DMSO
D-Desnaturalizacion

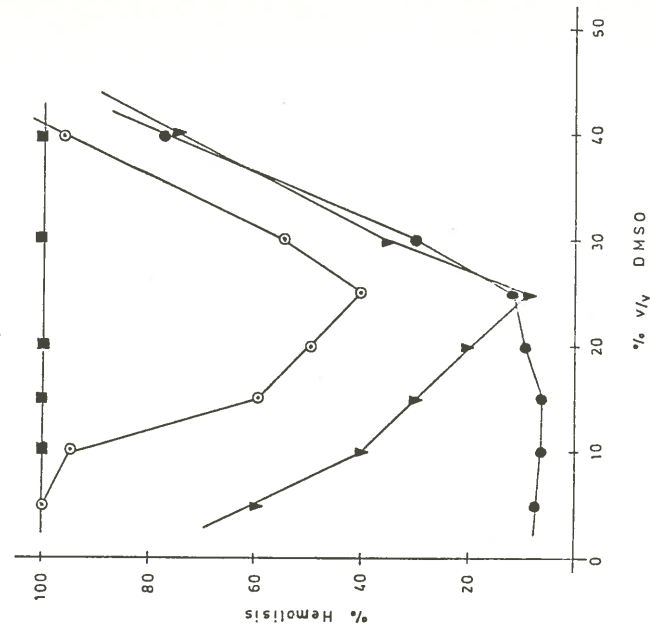


GRAFICA 19

Feneticilina
 $\bullet = 3,7 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$
 $\blacktriangledown = 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$
 $\odot = 9,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$
 $\blacksquare = 12,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

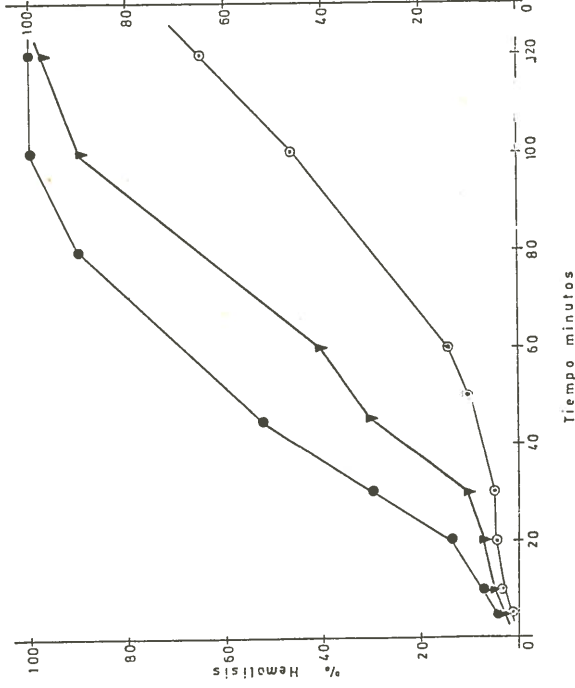


Oxacilina
 $\bullet = 3,2 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$
 $\blacktriangledown = 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$
 $\odot = 7,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$
 $\blacksquare = 9,0 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$

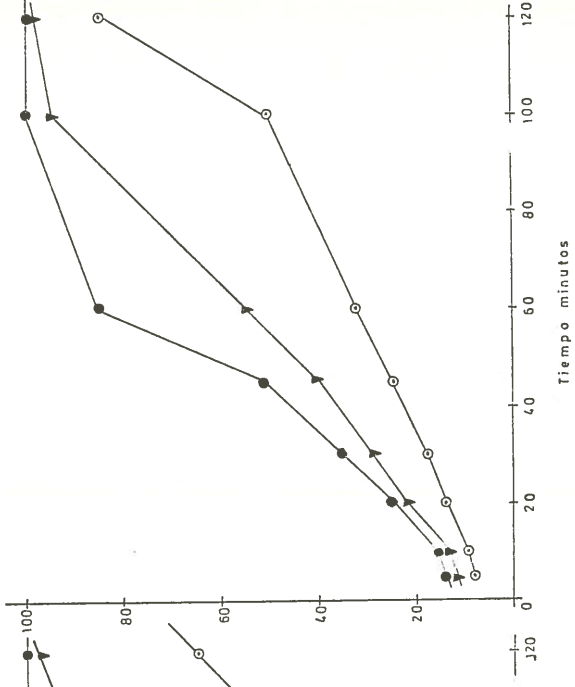


GRAFICA 20

Feneticilina $C = 6,6 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ $\left\{ \begin{array}{l} \bullet = 0\% \text{ DMSO} \\ \blacktriangledown = 5\% \text{ DMSO} \\ \circ = 20\% \text{ DMSO} \end{array} \right.$



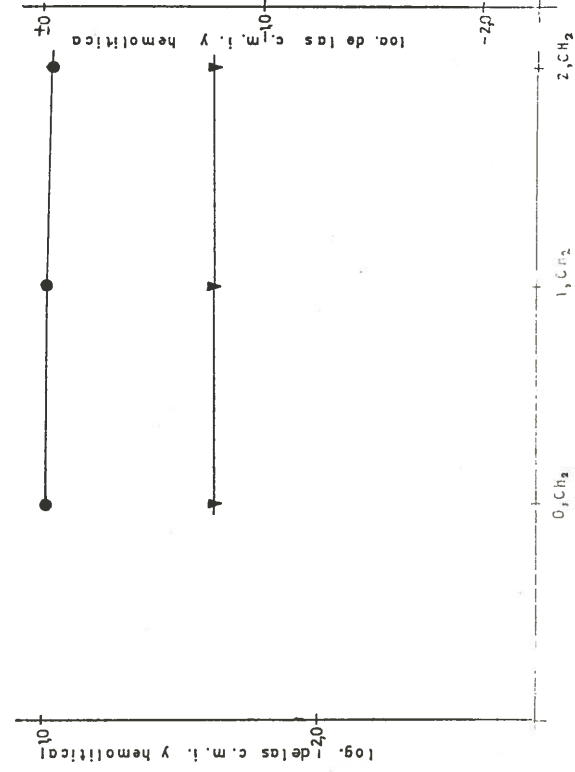
Oxacilina $C = 4,8 \cdot 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ $\left\{ \begin{array}{l} \bullet = 0\% \text{ DMSO} \\ \blacktriangledown = 5\% \text{ DMSO} \\ \circ = 20\% \text{ DMSO} \end{array} \right.$



GRAFICA 21 (b)

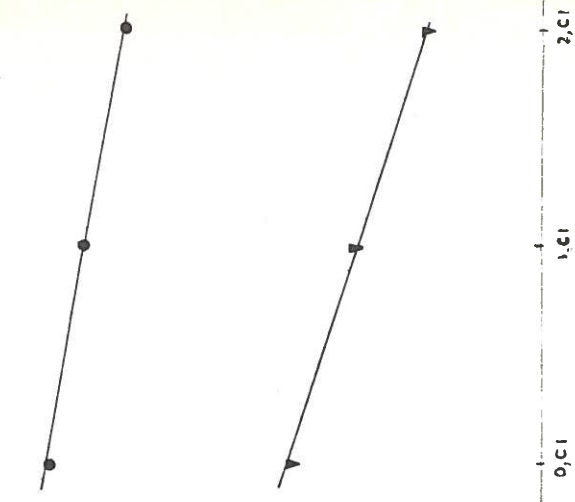
(a)

Concentracion hemolitica
v c. m. i.



GRAFICA 22

Concentracion hemolitica
v c. m. i.



GRAFICA 23

Sample Oxacilina Na

Purity 99.3%

Origin T. Doctoral

Solvent 80% H₂O + 20% DMSO

Concentration 0.2mg/ml

Molarity _____

Cell path length 1 cm

Reference H₂O + DMSO

Scanning time _____

λ 2 5 10 20 50 100

Scale expansion 1 X

Time constant _____

0.1 0.2 0.5 20

Sensitivity _____

Range _____

A Ext T % Transm E 94 Energy

Slit _____ mm for $\lambda = 360$ nm

Tungsten - H₂ lamp _____

PbS Multiplier x1 x20

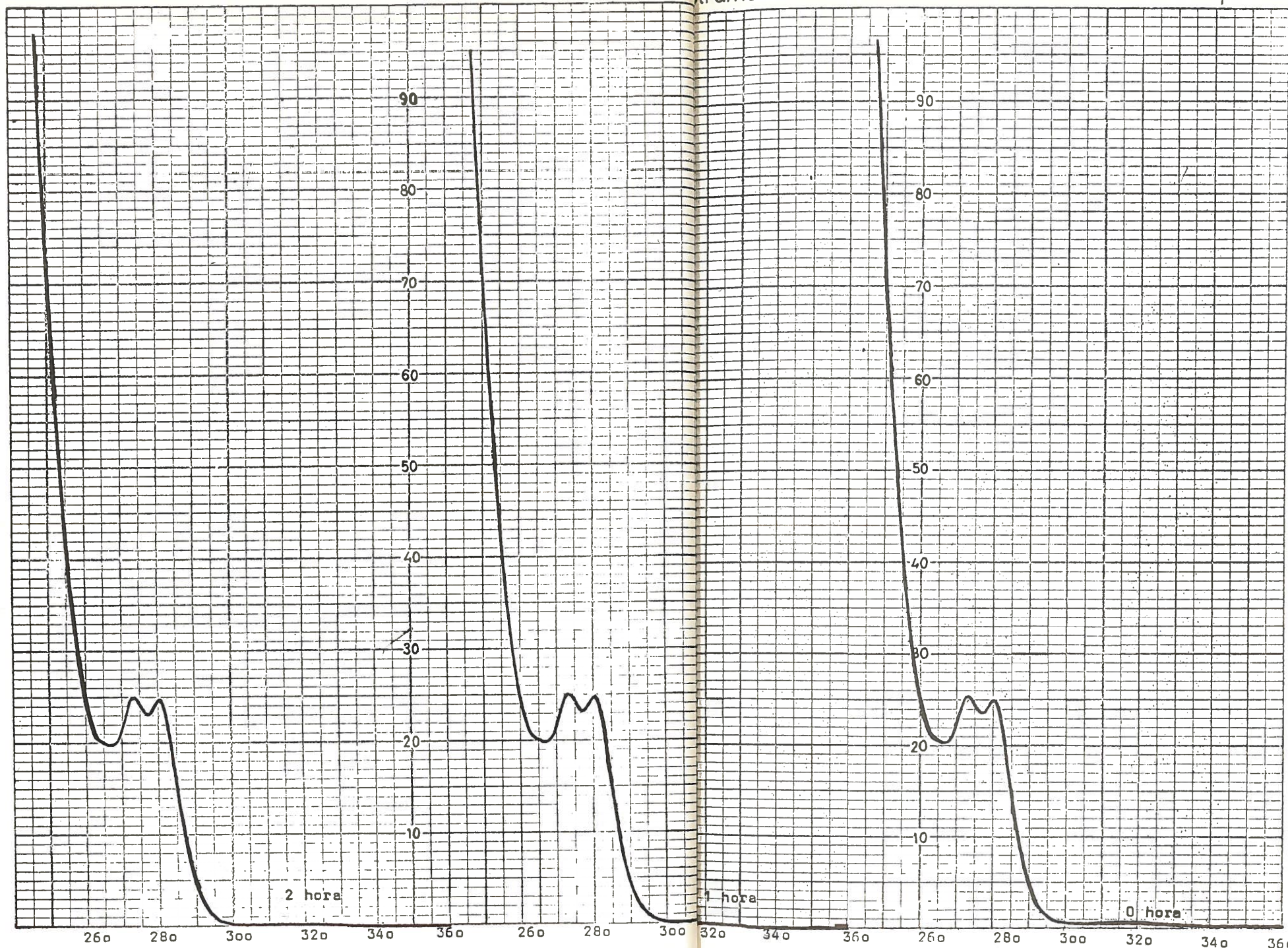
λ - Range 360 - 240

Temperature 25°C

Inert gas _____

Date 3-IX-70

Analyst _____



Sample Feneticilina
K

Purity 99.2%

Origin T. Doctoral

Solvent 80% H₂O: 20%
DMSO

Concentration 0.2 mg/ml

Molarity

Cell path length 1 cm

Reference H₂O: +DMSO

Scanning time

1 2 5 10 20 50 100

Scale expansion 1 x

Time constant

0.1 0.2 0.5 20

Sensitivity 50

Range 0-100

A 1 E 94
Ext % Transm EnergySlit mm for $\lambda = 360$ nmTungsten-H₂ Lamp

PbS Multiplier x1 x20

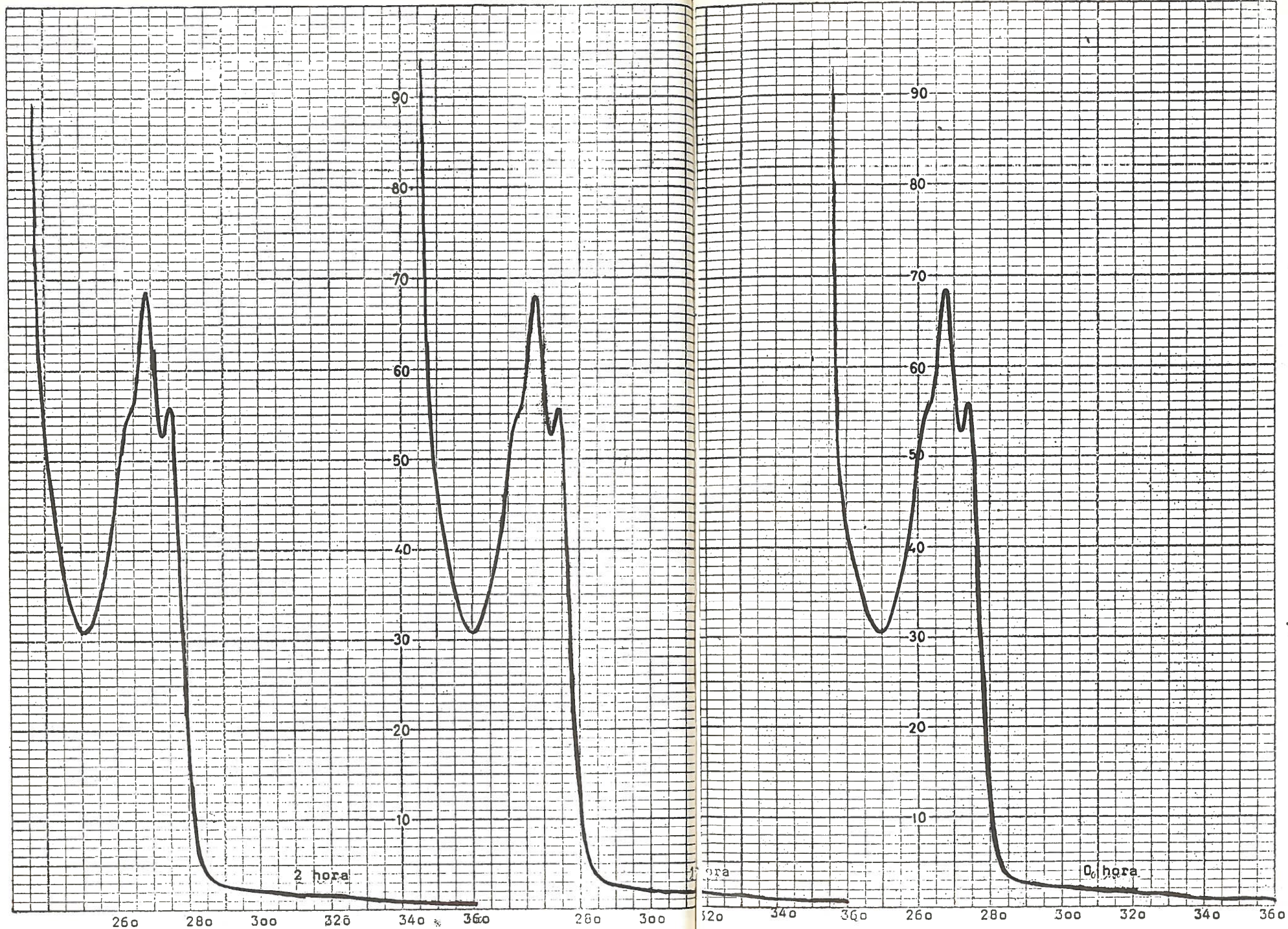
 λ -Range 360-240

Temperature 25°C

Inert gas

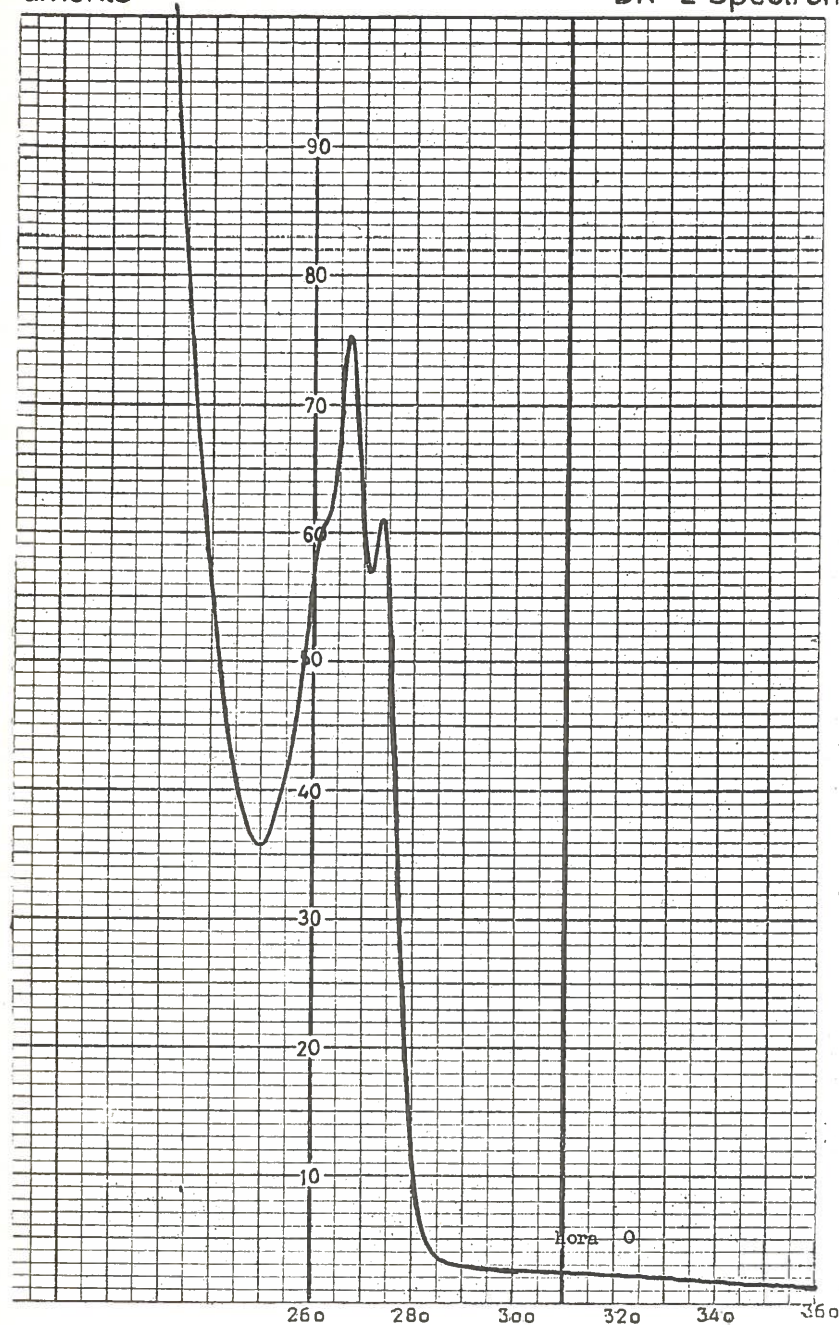
Date 4-IX-70

Analyst



uments

DK-2 Spectrum Nr



Sample Fenoxietilpenicilina-Na

Purity 99,2 %

Origin _____

Solvent H₂O

Concentration 0,2 mg/ml

Molarity _____

Cell path length 1 cm

Reference H₂O

Scanning time _____

1 2 5 10 20 50 100

Scale expansion 1 X

Time constant _____

0,1 0,2 0,5 2,0

Sensitivity 50

Range _____

A 1 E 94
Ext %Transm Energy

Slit _____ mm for $\lambda =$ _____ nm

Tungsten - H₂ Lamp _____

PbS Multiplier x1 x20

λ - Range 360-240

Temperature 25.0

Inertgas _____

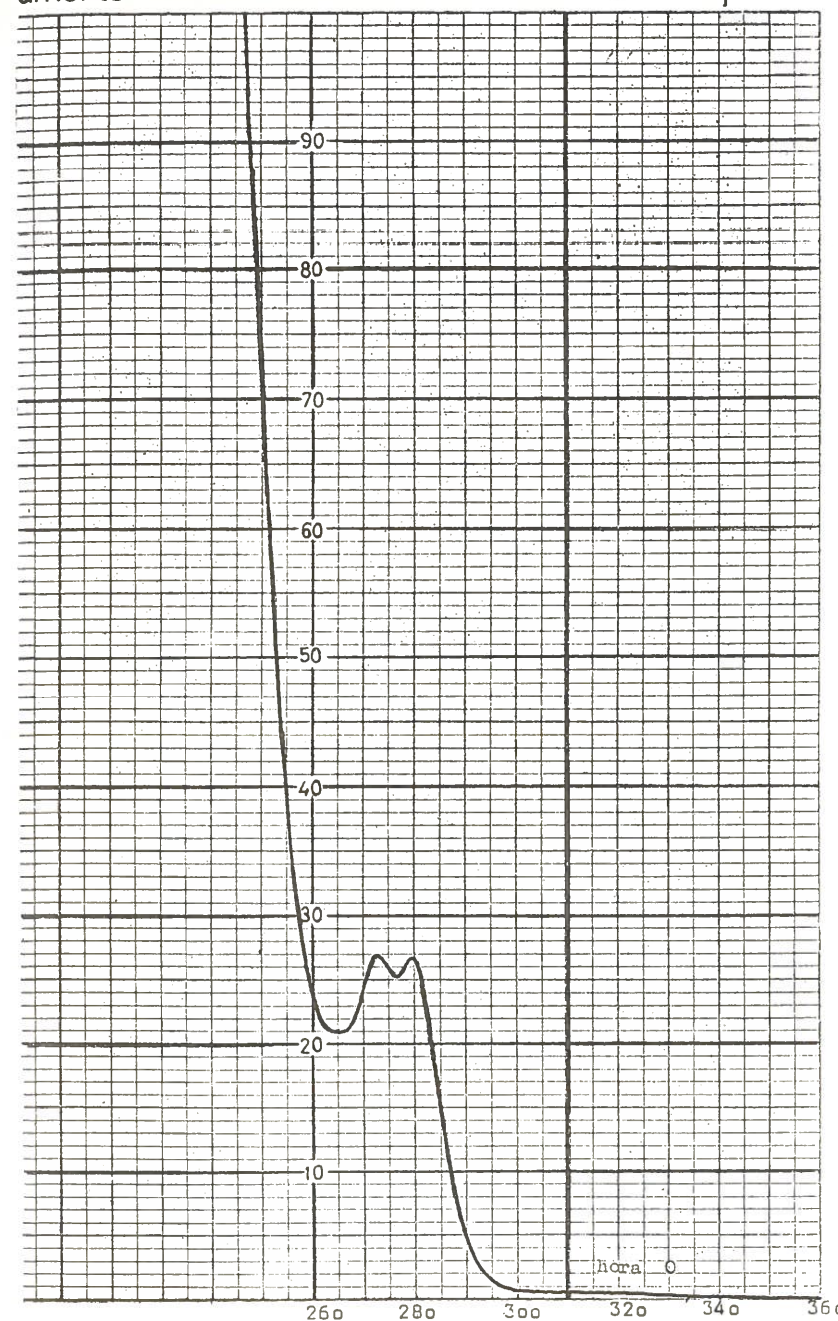
Date 2-IX-70

Analyst _____

hora 0

uments

DK-2 Spectrum Nr



Sample Oxacilina-Na

Purity 99,3

Origin _____

Solvent H₂O

Concentration 0,2 mg/ml

Molarity _____

Cell path length 1 cm

Reference H₂O

Scanning time _____

1 2 5 10 20 50 100

Scale expansion 1 X

Time constant _____

0,1 0,2 0,5 2,0

Sensitivity 50

Range _____

A 1 E 94
Ext %Transm Energy

Slit _____ mm for $\lambda =$ _____ nm

Tungsten - H₂ Lamp _____

PbS Multiplier x1 x20

λ - Range 360-240

Temperature 25.0

Inertgas _____

Date 3-IX-70

Analyst _____

hora 0