

Tesis de Posgrado

Dosaje foto-colorimétrico de sulfanilamidas en líquidos orgánicos

Lambardi, Horacio Alberto

1942

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Química de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lambardi, Horacio Alberto. (1942). Dosaje foto-colorimétrico de sulfanilamidas en líquidos orgánicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0295_Lambardi.pdf

Cita tipo Chicago:

Lambardi, Horacio Alberto. "Dosaje foto-colorimétrico de sulfanilamidas en líquidos orgánicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1942.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0295_Lambardi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Trabajo de Tesis por:

Heracio Alberto Lambardi.

D O S A J E F O T O - C O L O R I M E T R I C O
D E
S U L F A N I L A M I D A S E N L I Q U I D O S O R G A N I C O S

19

- - • 0 • 0 • - -

Elsis: 295

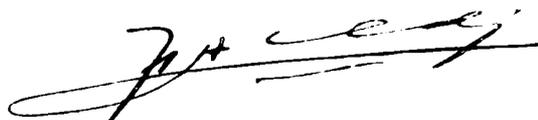
Doctorado en Química.

F.C.E.F.N.

POEMA

La iniciación de estas humildes líneas, sean de reconocimiento a mis maestros del Doctorado en Química; y, de eterno agradecimiento al Dr. Venancio Leulofeu, que supo orientar en todo momento, la forma de allanar las dificultades que se presentaron; y al Dr. Rogelio A. Trelles, que con la gentileza que siempre le ha caracterizado, puso a disposición del suscrito, todos los elementos necesarios, incluso el laboratorio de Bioras Sanitarias de la Nación, haciendo de esta manera posible la realización del trabajo.

A todos ellos muchas gracias.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Trelles', written in a cursive style with a long horizontal flourish at the end.

1) Resumen de los antecedentes bibliográficos

Cuando Domagk, presentó en 1935 sus trabajos sobre la acción quimioterápica del: 4-sulfonamido, 2-amino-6-metil-pyrimidino, se pensó que se había encontrado la solución al tratamiento de numerosas infecciones; hasta que fueron apareciendo las contrariedades. Su gran toxicidad, que hizo del producto, una sustancia de índice terapéutico muy bajo.

Se pensó que la acción quimioterápica del producto residía en el grupo diazo. Los investigadores franceses, Trefoul y colaboradores, (12) tratando de comprobar ésto, descubrieron que la acción bactericida, era debida al grupo: p-aminobenzenosulfonamido, confirmado luego por Colebrook en Inglaterra.-

La acción bactericida del p-aminobenzenosulfonamido puro sobre el estreptococo hemolítico, oscilaba "in vitro", en concentraciones de 1/10.000 a 1/18.000. "In vivo" las concentraciones necesarias para una acción terapéutica, son mucho mayores, apareciendo a veces efectos tóxicos sobre riñon e hígado.

Procurando disminuir su toxicidad y aumentar su solubilidad se prepararon numerosos derivados del p-aminobenzenosulfonamido, adoptandose para esas sustancias el nombre de: "SULFAMIDAS". Los autores: Long P. and Bliss (2); citan diez derivados que se emplean terapéuticamente; estableciendo que la droga, no tiene ningún efecto curativo, en concentraciones que tengan menos de 15 mg. por 100 ml. de sangre. El inconveniente que presentaron estos compuestos, fué la intolerancia, en algunos pacientes, en dosis poco más elevada que la terapéutica.-

Los sulfanilamido derivados citados por los autores Long and Bliss (2), y otros que posteriormente han tenido gran empleo terapéutico; son los siguientes:

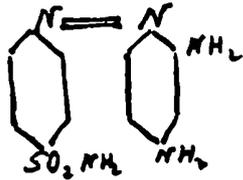
Nombre químico



p-aminobenzenesulfonamida.

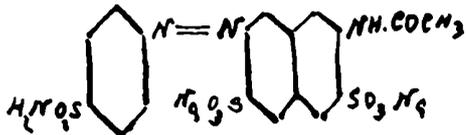
Nomenclatura médica

Prontylin-Streptocide-
rontosil album-
Lysococcine-Sulfamida
(1162 F)
Sulfanilamida



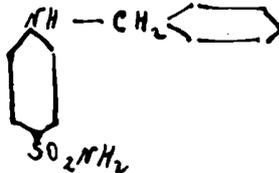
4-sulfonamido-2,4diamino-
benzene.

Prontosil
Prontosil flavum.



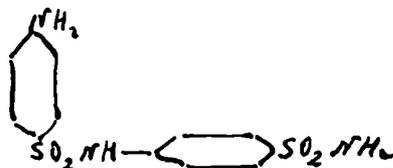
4-sulfonamidofenil-2-azo-
7-acetilamino-1-hidroxinaf-
til-3-6-disulfonatosódico.

Neoprontosil
rontosil soluble



N4-bencilsulfanilamida

Septacine
Proseptacine
(46 R.P)

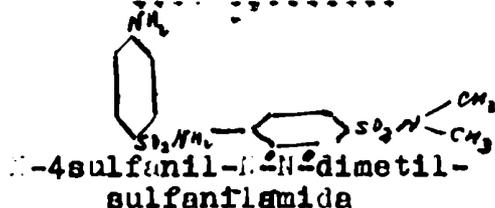


N4-sulfanilsulfanilamida.

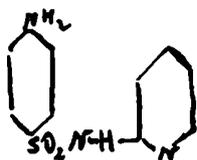
Disulfón.

Nombres químicos

Nomenclatura médica

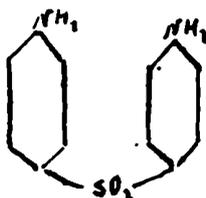


Ulirón
Ulirón

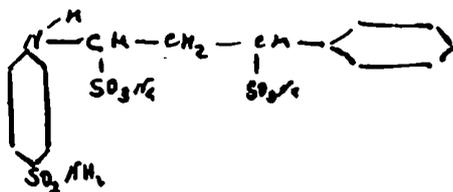


2-sulfenilamidopiridina.

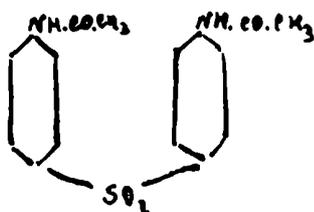
M 8 3 693
Dagenan
Sulfopiridina



4-4'-diaminodifenilsulfona

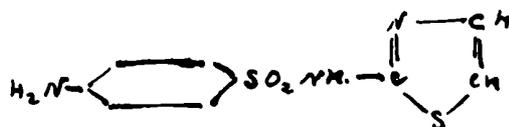


Coluseptacine.



4-4'-diacetildiaminodifenil sulfona.

Rodilone

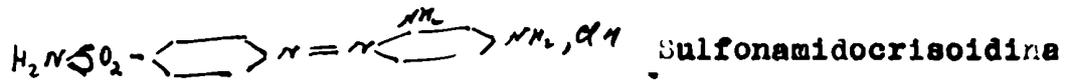


Sulfatiazol
Gibazol

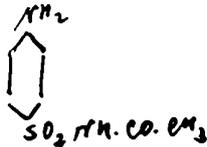
sulfanilaminotiazol.

Nombre químico

Nomenclatura médica



4-sulfonamido-2-4diaminoazobenzol.



Albucid

p-aminobencenesulfonacetamida.

La necesidad de controlar la concentración de las antierodrogas, en sangre y orina, nos ha llevado a estudiar uno de los métodos colorimétricos de dosaje.

Teoría de las mediciones fotométricas y descripción
de los aparatos empleados

Para poder aplicar al dosaje de una sustancia, una reacción colorimétrica, es necesario ver si cumple la ley de Beer.

Supongamos un haz luminoso de rayos paralelos, proveniente de una fuente luminosa, lámpara fig. 1, cuya intensidad llamamos I_1 . Es obvio, que la luz al atravesar una capa, de una cierta sustancia x no saldrá con la misma intensidad que entró, por lo tanto emergerá con una intensidad I_e .

Si la luz que penetra en un cuerpo es totalmente absorbida, se dice que este espacio, caso contrario es translúcido o transparente. Siendo estos dos términos usados para mencionar el fenómeno, sin que interprete la relación existente I_1 y I_e .

El valor de la relación $\frac{I_e}{I_1} \leq 1$ denominaremos factor de absorción

Este factor debe ser una: $F(\lambda, d, c, \rho)$ siendo:

I_1 = intensidad del haz luminoso incidente.

I_e = " " " " emergente.

λ = frecuencia de la radiación.

d = espesor que atraviesa el haz luminoso.

ρ = coeficiente de extinción. (constante que para cada frecuencia, solo depende de la sustancia absorbente y de la unidad de longitud elegida)

c = concentración de la sustancia que por absorción de las radiaciones produce el color.

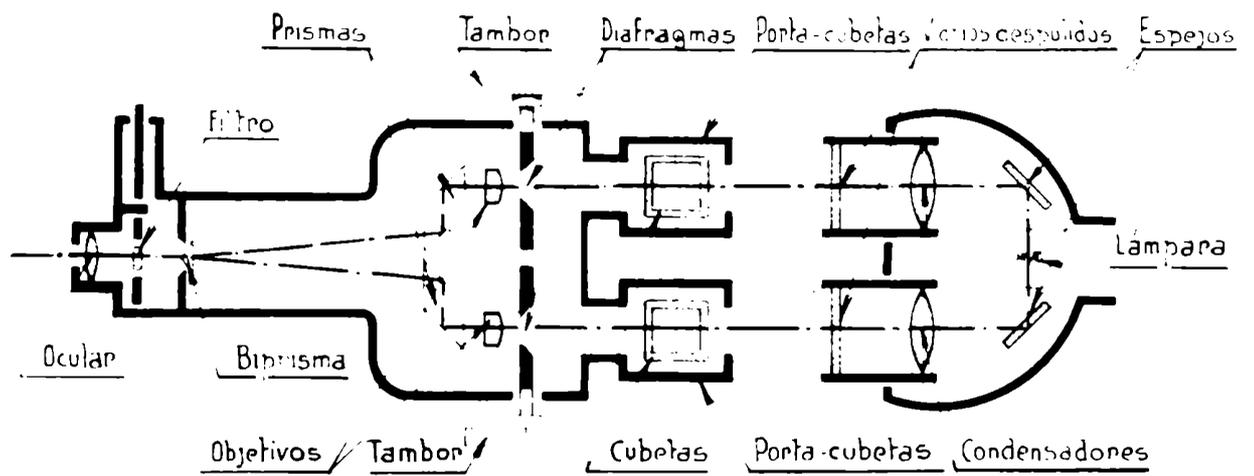
Lo mismo que para la reflexión, el factor de absorción depende de la frecuencia de la radiación, siendo algunas más fácil absorbidas que otras.

Necesariamente la intensidad de la radiación emergente, depende del número de partículas que encuentre al atravesar el campo, por eso, el factor de absorción debe darse por unidad de espesor y en función de su concentración.

Se deduce que el coeficiente de absorción está ligado con la d , ρ y la c , mediante la ecuación:

$$I_e = I_1 e^{-\rho d c}$$

conocida como la ley de



— Fig. N° 1 —

Supongamos ahora una sustancia coloreada, para la cual se cumple la ley de Beer. Consideremos concentraciones variables: $C_1; C_2; \dots \dots C_n$. Entre estas y los factores de absorción, podremos ligarlos en las siguientes formas:

$$\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_1} = 10^{-\epsilon d c_1}, \quad \left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_2} = 10^{-\epsilon d c_2}, \quad \left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_n} = 10^{-\epsilon d c_n}$$

Tomando logaritmos: $\log\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_1} = -\epsilon d c_1$, $\log\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_2} = -\epsilon d c_2$, $\log\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_n} = -\epsilon d c_n$

$$\frac{c_1}{\log\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_1}} = \frac{c_2}{\log\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_2}} = \frac{c_n}{\log\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_n}} = \frac{1}{\epsilon d} = k$$

Esta constante dependerá para cada sustancia de; la longitud d de la sustancia absorbente, y de la unidad elegida para medir o .

La constante k es factible de ser determinada experimentalmente; los factores de absorción: $\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_1}, \left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_2}, \left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_n}$

son medibles en aparatos llamados fotómetros. Conocida la k y determinados los factores de absorción, se determinan las concentraciones mediante las fórmulas:

$$c_n = k \log\left(\frac{I_e}{I_0}\right)_{c_n}$$

Nosotros utilizamos para las anteriores determinaciones el:

FOTOMETRO DE FUEBRICH-ZEISS

Como hemos visto en la determinación de los coeficientes de absorción, interviene la longitud de onda, razón que implica la necesidad de utilizar luz monocromática. Los espectrofotómetros poseen prismas de dispersión, que permiten obtener luz monocromática.

El fotómetro de Mulfrich-Weiss, no es espectrofotómetro; pero es posible obtener luz de suficiente pureza, para la determinación de las experiencias, mediante 8 filtros espectrales; que dividen el espectro visible, muy aproximadamente en 8 partes iguales.

Cada una de estas partes difieren entre sí, en unos 30 a 45μ . Estos filtros están montados en un tambor a revólver, lo que permite intercambiarlos con facilidad. Se los designa mediante la letra mayúscula S y un número, que es aproximadamente la décima parte del valor promedio, de la longitud de onda, que proporciona.

Acompañamos las figuras 1 y 2 lo que nos evitará hacer una descripción sucinta del aparato.

Los coeficientes de absorción de las sustancias, igualados en el otro campo mediante dos diafragmas, cuadrangulares, que al girar, lo hacen: los lados consecutivos opuestos, en la dirección de la diagonal del cuadrado. De forma tal que su centro esté colocado siempre en el mismo lugar, sobre el eje óptico del aparato (fig. 2).

Si llamamos:

α = ángulo de rotación del tambor.

S = área de la abertura del diafragma, correspondiente al ángulo

D = longitud de la diagonal del diafragma que corresponde al ángulo de rotación α

L = lado del diafragma correspondiente al ángulo de rotación α

I = intensidad del haz luminoso cuando la abertura es S

I_0 = intensidad del haz luminoso cuando la abertura es máxima.

Para poder relacionar todos estos valores, elegimos el lado del diafragma como unidad, cuando su abertura es máxima. Luego al girar el tambor tendremos:

$$\begin{aligned} \text{Para: } \alpha = 0 & ; S = 0 ; L = 0 ; I = 0 ; D = 0 \\ \alpha = 360 & ; S = 1 ; L = 1 ; I = I_0 ; D = \sqrt{2} \end{aligned}$$

Como al giro completo, es decir 360° corresponde, extinción total del diafragma, la abertura S , está relacionada con el ángulo α , siendo la diagonal D , función lineal de α .

Por lo tanto:

$$\frac{D}{\sqrt{2}} = \frac{\alpha}{360} \quad (1)$$

y por otra parte como sabemos que:

$$\frac{I}{I_0} = \frac{S}{1} \quad S = \ell^2 = \frac{D^2}{2}$$

y sustituyendo en (1)

$$\alpha = 360 \sqrt{\frac{I}{I_0}}$$

Los tambores, fueron graduados de forma que, cada división de α , corresponda a los valores $\frac{I}{I_0}$ que resulta de la expresión anterior.

Sobre cada tambor hay dos escalas: una en negro que indica $\frac{I}{I_0} \cdot 100$ y otra en rojo que nos da $\text{Log} \frac{I}{I_0}$

Supongamos ambos tambores colocados en 0, escala en rojo, los campos están igualmente iluminados; interponemos en uno de los campos, una cubeta, una cubeta con la solución coloreada a determinar, y en otro de igual longitud, agua destilada, los campos han variado su intensidad de luz. Será necesario correr el tambor que corresponde al agua destilada, hasta que el campo total del ocular resulte homogéneamente iluminado.

La lectura en rojo corresponde a un cierto valor $\log \frac{I_1}{I_0}$ que coincide con $\log \frac{I}{I_0}$ que es lo que queríamos demostrar.

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE LOS METODOS ACTUALES

La necesidad de encontrar un método fácil de dosaje, de las sulfanilamidas, que permitiera conocer con exactitud, la concentración en el sangre de las mismas, indujo a Marshall, en 1937 (1); buseara un método cuantitativo rápido, basado en una diazotación del amino grupo. Es aplicable el método, para las siguientes sulfanilamidas: p-aminosulfonamida; N4-sulfanilsulfanilamida; N4-sulfanil-N-N'-dimetilsulfanilamida; 2-sulfanilamidopiridina; sulfanilamidotiazol; y la p-aminosulfanilamida acetilada. El método es solamente aplicable a estas sulfanilamidas puesto que exige el amino grupo libre.

La primitiva técnica de Marshall (1); desproteíniza con alcohol, diazota en la forma corriente, y copula con la dimetilnftilamina, en solución alcohólica, que él mismo posteriormente reemplaza por, la etilenaftildiamina.

Modificación Marshall (Marshall. Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. N.º 3 de 1937). Utiliza el ácido paratoluensulfónico como desproteínizante; cuya acidez puede ser utilizada para diazotar y aun para hidrolizar el compuesto conjugado. Para favorecer la hemólisis de los hemáties se utiliza solución de saponina al 0,05 %.

La técnica de Hamlet-Marshall (5), utiliza el ácido tricloroacético al 5 % como desproteínizante; y en todo lo otro muy semejante con la primitiva técnica de Marshall.

Berner (12), en cambio de diazotar, trata la sangre desproteínizada con ácido tricloroacético al 5 %, con p-dimetilaminobenzaldehído, su método no es tan exacto como los anteriores, pero que se presta admirablemente para la titulación aproximada; tampoco es específico, como no lo es la de Marshall, las dan, todas las aminas cíclicas, siempre que la función amino no esté bloqueada, y se debe tener presente cuando al enfermo se le ha hecho tratamientos con novocaína.

Mlle. Ramonn (12) del laboratorio de quimioterapia del Instituto Pasteur de París, desproteíniza con ácido tricloroacético al 5 %, diazota en la forma corriente y copula con solución alcohólico-cetónica de afdimetilnaftilamina a la concentración de 1:250.

F.M. Hartmann (13) utiliza en cambio de la amina terciaria los

fenoles, cuya velocidad de reacción es mayor que la de las aminas.

- - - - -

PRODUCTOS TERAPÉUTICOS ESTUDIADOS

Decididos a ensayar los métodos con sulfanilamidas, tropezamos con dificultades para la obtención de ciertas drogas en estado de pureza. La casa "Bayer", nos facilitó: sulfanilamida, ulirón y prontosil rubrum, en estado de pureza; éste último no utilizable en nuestros trabajos.

El "albuclid" puro, nos fué facilitado por la casa "Schering".

En la sulfanilamidopiridina y en el sulfanilamidotiazol, hemos tenido que purificar la droga, a partir de los comprimidos.

Los excipientes que acompañan a las sulfanilamidas, son insolubles en alcohol, y en cambio, éstas son mucho más solubles en este disolvente, que en el agua; siéndolo aun mucho más en caliente que en frío; aprovechamos esta propiedad para separarlos. Pero, los preparados de algunas casas, tienen como excipiente, estearato de magnesio, que con el alcohol en caliente, da una tonalidad amarilla. Causa que nos impidió utilizar el extractor americano, debiendo separar la droga en frío y purificar por cristalización.

Las drogas por nosotros utilizadas en estos trabajos, fueron p-aminobencenesulfanilamida; p-aminobencenesulfanilacetoamida; p-aminobencenesulfanilamidotiazol y p-aminobencenesulfanilamidopiridina. Por ser las actualmente de mayor empleo terapéutico.

En cuanto al ulirón (N⁴-sulfanil-N²,N⁶-dimetilsulfanilamida) el método propuesto no dió resultado, puesto que los datos obtenidos no concordaban con las concentraciones calculadas; probablemente por ruptura de la molécula apareciendo dos amino grupo en cambio de uno, lo que hacía aparecer valores más altos que los debidos.

- - - - -

ESTUDIO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS.

En el resumen de los antecedentes bibliográficos, hicimos mención de algunos de los diferentes métodos de análisis. Nos decidimos a profundizar el método de Marshall, modificación de Mlle. Ramonn (5) del Laboratorio de Quimioterapia del Instituto Pasteur de Paris. Método en el cual se efectúa la desproteínización con ácido tricloroacético al 50 %, previa hemólisis con solución acuosa de saponina al 0,5 %; aprovecha la acidez del medio para diazotar con nitrito de sodio al 0,1 %; y agrega la amina terciaria, en solución acetona-alcohol en partes iguales, y a la relación de 1.250 de dimetilalfanaftilamina.

Tratamos en lo posible de trabajar con sustancias, existentes en los laboratorios de análisis biológicos. Para lo cual hicimos las siguientes modificaciones: utilizamos la concentración del ácido tricloroacético al 20 % en lugar del 50 %; variando solo la cantidad, en cambio de 2 ml. utilizamos 5 ml. para 2 ml. de sangre.

Como la función de la saponina es producir la hemólisis, la reemplazamos con agua destilada, (2,5,13), pero como la lisis de los hematies es mucho más lenta en este caso; esperamos 15^m. para tener la seguridad de hemólisis total.

Como el exceso de nitrito molesta, pues que provoca nitrosaciones, de coloración amarillenta, lo eliminamos después de formado el diazoico, con solución de urea al 10 %. Indiéndonos hacer esta eliminación con ácidoaminosulfónico (17), nosotros utilizamos la urea por ser esta una sustancia de fácil adquisición en los laboratorios de análisis biológicos.

La dimetilalfanaftilamina, en vez de usarla en solución de acetona-alcohol al 1:250; la reemplazamos por solución 1:100 en alcohol de 95%, (solución que tiene la ventaja de conservarse durante muchos meses) (12); diluyendo en el momento de usar en la proporción de 1.25 en alcohol de 95%.

Los diferentes métodos, (1;5), aconsejan esperar de 15 a 20 minutos, después de agregada la dimetilalfanaftilamina, antes de hacer las lecturas colorimétricas. Ensayamos nosotros con una concentración de 0,50 mg/10 ml. de solución, haciendo lecturas a los 10, 15, 20, 30 y a los 50^m viendo que las absorciones de luz iban en aumento, aparecen

do constancia ,en las muestras leidas a las 24 horas de estacionamie to.

Para evitarnos esta espera ,estudiamos la aceleración de la re acción por calentamiento,comparando los resultados obtenidos con los logrados por 24hs. de estacionamiento.

De la tabla siguiente se deduce .

g./hr.	
0,04	1) 0,25 2) 0,26 3) 0,25 0,256 calentado 20 ^m a 60 ^o . 4) 0,26 5) 0,26
0,08	1) 0,43 2) 0,44 3) 0,43 0,433 calentamos 20 ^m a 60 ^o . 4) 0,44 5) 0,43
0,04	1) 0,34 2) 0,320 3) 0,33 0,333 Calentamos 30 ^m a 60 ^o . 4) 0,347 0,328
0,08	1) 0,482 2) 0,470 3) 0,470 0,475 Calentamos 30 ^m a 60 ^o . 4) 0,476 5) 0,475
0,04	1) 0,350 2) 0,346 3) 0,340 0,344 calentamos 45 ^m a 60 ^o . 4) 0,342 5) 0,348

<u>C</u> <u>mg/100ml.</u>	
0,08	1) 0,478
	2) 0,478
	3) 0,484 0,475 calentamos 45 ^m a 60 ^o .
	4) 0,478
	5) 0,480
0,04	1) 0,248
	2) 0,243
	3) 0,243 0,244 sin calefacción leído a las 24 hs.
	4) 0,244
	5) 0,243
0,08	1) 0,410
	2) 0,407
	3) 0,410 0,411 sin calefacción leído a las 24 hs.
	4) 0,410
	5) 0,419

Como se observa la formación de colorante, es mayor a los 30^m a 60^o de temperatura, que la muestra leída a las 24 hs de estacionamiento y mantenida en frío. La permanencia de mayor tiempo, 45^m a 60^o, no dió aumento apreciable de color; por lo cual consideramos 30^m y la temperatura de 60^o como óptima para esta reacción.

Como Marshall (1), en su primer trabajo aconseja esperar 3^m antes de agregar la amina terciaria, para que la recuperación de la sulfanilamida sea del 100%. Por eso buscamos los tiempos óptimos para la diazotación; encontrando los siguientes resultados:

Experiencias realizadas sobre 1 ml. de 1% solución que corresponde a 0,1 mg de droga, obtuvimos:

$\frac{K_{10}}{T}$	$\frac{K_{10}}{T}$	$\frac{K_{15}}{T}$	$\frac{K_{20}}{T}$
1) 0,493	1) 0,554	1) 0,556	1) 0,558
2) 0,491	2) 0,548	2) 0,559	2) 0,557
3) 0,498 0,492	3) 0,550 0,556	3) 0,560 0,558	3) 0,558 0,557
4) 0,490	4) 0,560	4) 0,560	4) 0,564
5) 0,491	5) 0,552	5) 0,557	5) 0,559
tiempo 5 ^m	tiempo 10 ^m	tiempo 15 ^m	tiempo 20 ^m

Lo que nos indica que despues de los 10^m no hay ulterior formacion de diazoico.

Todo lo anterior plantea seis problemas:

- 1) Hemólisis.-2) Desproteínización.-3) Eliminación del exceso de nitrito
- 4) Elección de la amina terciaria y su solución.-5) Tiempo de diazotación.-6) Tiempo de lectura.

1) En su primitiva técnica Marshall no hemolisaba (1); modificada por él mismo en 1937 (18); Kamlet-Marshall lo hace con solución de saponina al 0,5% (5), al igual que la modificación de Marshall del 1937 (18). Mlle Hamonn utiliza el agua destilada como hemolisante. La ventaja que este procedimiento aporta es obvio.

2) Desproteínización: los desproteínizantes clásicos son el alcohol y el ácido tricloroacético a distintas concentraciones; en capítulos anteriores ya lo hemos tratado con las correspondientes citas bibliográficas: (1;18;5;2;12). El hecho que nos otros hayamos adoptado el tricloroacético a la concentración del 20% es; la posibilidad de encontrarlo en todo laboratorio de análisis biológico.

3) La eliminación del nitrito antes de agregar la amina terciaria ya aparece en el trabajo de Marshall de 1937 (18); todos los otros investigadores lo continúan haciendo, ya variando la sustancia ácido paratoluensulfónico (18); urea (5;17); o bien modificando la concentración de estas (17), (5); nosotros utilizamos solución de urea al 10%.

4) La elección de la amina terciaria, fue fácil, puesto que al iniciar estos trabajos no existía ninguna de las citadas en la bibliografía (1;2;5;17;18) y tuvimos que prepararnos una, elegimos la dimetilalfa-naftilamina por parecernos la de mas fácil ejecución.

5, Marshall en su primitiva técnica (1), indica la necesidad de esperar 3 minutos antes de copular, o sino multiplicar por un cierto factor, para tener la certeza de recuperar el 100% de sulfanilamida. Realizado el ensayo por nosotros, encontramos que pasados los 10^m no hay prácticamente formación de diazoico; con lo cual transcurridos los 10^m eliminábamos el exceso de nitrito con solución de urea.

6) Marshall en (1 y 18) aconseja esperar varios minutos antes de la lectura colorimétrica; en igual forma proceden Hamlet (5) y Mlle. Lamou (5); nosotros realizamos los ensayos en frío y obtuvimos constancia recién a las 24hs., lo que nos movió a estudiar la aceleración de la reacción por calentamiento a diferentes temperaturas y tiempos, llegando a la conclusión que la óptima es de 60^o C. y 30^m de espera.

- - - - -

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE K PARA LAS
SULFANILAMIDAS ESTUDIADAS

Como se ha visto por la teoría desarrollada en la página es indispensable la determinación de la constante $K = \frac{A}{c \cdot l}$ para cada sustancia.

Para lo cual preparamos soluciones de: p-aminobencenesulfanilamida; p-aminobenceneacetilsulfonamida; p-aminobencenesulfonamido-2-piridina; p-aminobencenesulfonamidotiazol; que contenían 10 mg. de cada una de estas drogas, en 100 ml. de solución; hecha en caliente, enfriada y llevada a volumen. Tomamos cantidades variables de estas soluciones, les agregamos 2,5 ml de solución de ácido tricloroacético; 6,5 ml. de agua, 1 ml. de solución reciente de nitrito de sodio al 1%, esperamos 10 minutos, luego agregamos 3 ml. de solución de urea al 10%; y esperábamos hasta ausencia de ión nitrito, con papel ozonoscópico, verificado esto agregamos 5ml. de solución alcohólica de dimetilnaftilamina al 1;250; y calentamos durante 30^m a 50-60^o C. Estas soluciones las realizábamos en matraces de 50 ml., que luego llevábamos a volumen y leíamos en el fotómetro de Pulfrich, con el filtro 50.

Como se observa de los gráficos, hay una marcada proporcionalidad entre concentración y $\log \frac{I_0}{I}$.

Obteniendo para las antedichas soluciones, los siguientes valores que a su vez representamos, las curvas características de cada sustancia:

p-aminobencenesulfonamida

$\lambda_{max} \frac{I}{\text{cm}}$	$\frac{c}{\text{mg}/100\text{ml}}$	$k = \frac{c}{100 \frac{I}{\text{cm}}}$	$k - k_m 100$
1) 0,117			
2) 0,120			
3) 0,125 0,122	0,04	0,327	- 8 %
4) 0,120			
5) 0,122			
1) 0,230			
2) 0,225			
3) 0,226 0,226	0,08	0,354	---
4) 0,225			
5) 0,225			
1) 0,325			
2) 0,320			
3) 0,328 0,325	0,12	0,368	4 %
4) 0,333			
5) 0,322			
1) 0,440			
2) 0,440			
3) 0,450 0,445	0,16	0,357	---
4) 0,445			
5) 0,450			
1) 0,550			
2) 0,556			
3) 0,545 0,553	0,20	0,361	---
4) 0,558			
5) 0,560			

Sulfanilamida

\downarrow 0,01
 \leftarrow 0,020

\leftarrow kem = 0,353

p-aminobenzenesulfonacetamida.

$\log \frac{F}{I_0}$	$\frac{e}{\text{mg}/100 \text{ ml}}$	$k = \frac{e}{\log \frac{F}{I_0}}$	$\frac{k - k_0}{k_0} \cdot 100$
1) 0,209			
2) 0,189			
3) 0,185 0,197	0,08	0,406	---
4) 0,197			
5) 0,193			
1) 0,298			
2) 0,339			
3) 0,305 0,298	0,12	0,403	---
4) 0,383			
5) 0,305			
1) 0,394			
2) 0,403			
3) 0,413 0,401	0,16	0,400	---
4) 0,393			
5) 0,403			
1) 0,497			
2) 0,493			
3) 0,493 0,492	0,20	0,407	---
4) 0,491			
5) 0,489			
1) 0,623			
2) 0,633			
3) 0,593 0,615	0,24	0,390	-2%
4) 0,604			
5) 0,623			

Albuciol

↓ 0,01 %
↓ 0,02 %

↓ sam 0,401

p-aminobencenesulfonamido-2-piridina.

6

$\frac{I}{I_0}$	$\frac{c}{\text{mg}/100\text{ml}}$	$h = \frac{c}{k \cdot t}$	$\frac{h \cdot k_{\text{m}}}{k_{\text{m}}}$
1) 0,171			
2) 0,177			
3) 0,164 0,170	0,08	0,519	-7%
4) 0,170			
5) 0,170			
1) 0,246			
2) 0,260			
3) 0,255 0,252	0,12	0,519	-7
4) 0,255			
5) 0,250			
1) 0,327			
2) 0,322			
3) 0,323 0,324	0,16	0,557	---
4) 0,335			
5) 0,321			
1) 0,400			
2) 0,396			
3) 0,406 0,405	0,20	0,598	7%
4) 0,410			
5) 0,412			
1) 0,488			
2) 0,490			
3) 0,480 0,487	0,24	0,598	8%
4) 0,487			
5) 0,491			

Sulfamildipiridina

↓ 0,01%
↓ 0,02% km 0,558

p-aminobencenesulfonamidotiazol.

6

$\frac{L_{\text{exp}}}{L_{\text{th}}}$	$\frac{C}{\text{mg/l. ml}}$	$A = \frac{C}{L_{\text{th}}}$	$\frac{(A - A_m) 100}{A_m}$
1) 0,157			
2) 0,158			
3) 0,161	0,158	0,08	-3%
4) 0,156			
5) 0,158			
1) 0,220			
2) 0,222			
3) 0,228	0,225	0,12	2%
4) 0,226			
5) 0,222			
1) 0,305			
2) 0,302			
3) 0,310	0,306	0,16	---
4) 0,312			
5) 0,304			
1) 0,371			
2) 0,373			
3) 0,375	0,373	0,20	2%
4) 0,373			
5) 0,375			
1) 0,459			
2) 0,460			
3) 0,462	0,459	0,25	---
4) 0,460			
5) 0,458			

Sulfani lamidolazol,

↓ 0.01%
↔ 0.02%

kan 0,527

$$\frac{0.01}{1.0}$$

ENSAYOS DE REACCIÓN

Para estudiar que el método podía ser aplicado a los dosajes en sangre y orina, se añadieron cantidades pesadas de sulfanilamidas, a esos medios, y se procede a su dosificación, utilizando las curvas obtenidas y, además aprovechamos para efectuar una comprobación colorimétrica, con solución tipo empleando un colorímetro Leitz.

Procediendo para los dosajes en sangre en la siguiente forma:

A 2 ml. de sangre les agregábamos cantidades variables; de soluciones de p-aminobencenesulfonamida; p-aminobencenesulfonacetomida; p-aminobencenesulfonamidopiridina; p-aminobencenesulfonamidofotazo en concentraciones de 0,1 mg por ml. de solución; dejábamos en reposo 2 horas; y luego les agregábamos agua destilada hasta completar el volumen de 15 ml., esperábamos 15 minutos hasta hemólisis total, y luego ~~añad~~ 5 ml. de solución de ácido tricloroacético al 20 %, gota a gota y agitando; filtramos tomamos 10 ml. del filtrado, agregamos 1 ml. de solución reciente de nitrito de sodio al 0,1 %, esperamos 10 ^m. y agregamos 5 ml. de solución de dimetilalfanatilamina en solución alcohólica al 1:250, calentamos a 50-60 °C. durante 30 ^m., llevamos a volumen en matraces de 50 ml., y leíamos los coeficientes de absorción en el fotómetro de Sulfrich.

Los volúmenes agregados de sulfanilamida fueron: 1; 2; y 2,4 ml. de la solución madre, obteniendo las siguientes absorciones, que multiplicadas por la k determinada, en los trabajos preliminares, nos dan los siguientes resultados:

p-aminobenzenesulfonamida.

		FOTOMETRO		Colormetro	
$\frac{I_0}{I_e}$	$\frac{c}{mg/ml}$	$\frac{c}{mg/ml}$	$\frac{c}{mg/ml}$	$\frac{c}{mg/ml}$	$\frac{c}{mg/ml}$
1) 0,263					
2) 0,260					
3) 0,272	0,265	0,100	0,098	0,110	
4) 0,268					
5) 0,262					
1) 0,530					
2) 0,542					
3) 0,538	0,537	0,200	0,190	0,192	
4) 0,542					
5) 0,536					
1) 0,620					
2) 0,635					
3) 0,632	0,628	0,240	0,222	0,220	
4) 0,621					
5) 0,632					

p-aminobencenesulfonacetoamida.

FOTOMETRO		COLORIMET.	
$\frac{I_0}{I_c}$	$\frac{c}{mg/100 ml}$ <i>ayres</i>	$\frac{c}{mg/100 ml}$ <i>cale.</i>	$\frac{c}{mg/100 ml}$
1) 0,249 2) 0,250 3) 0,246 0,248 4) 0,248 5) 0,247	0,100 0,100	0,094	0,108
1) 0,498 2) 0,480 3) 0,483 0,487 4) 0,485 5) 0,490	0,200	0,195	0,205
1) 0,613 2) 0,610 3) 0,618 0,612 4) 0,609 5) 0,614	0,240	0,245	0,225

p-aminobencenesulfonamidopiridina

FOTOMETRO			Colorimet.
$\log \frac{I_0}{I_c}$	$\frac{c}{mg/100ml}$ agua	$\frac{c}{mg/100ml}$ color	$\frac{c}{mg/100ml}$ color
1) 0,201 2) 0,200 3) 0,198 0,199 4) 0,201 5) 0,195	0,100	0,109	0,116
1) 0,400 2) 0,386 3) 0,384 0,394 4) 0,400 5) 0,396	0,200	0,214	0,205
1) 0,479 2) 0,470 3) 0,480 0,455 4) 0,477 5) 0,470	0,240	0,253	0,215

p-aminobencenesulfonamidotiazol

FOTOMETRO			COLORIMET'	
L_{oc}	$\frac{I_c}{I_e}$	$\frac{C}{mg/100ml}$	$\frac{C}{mg/100ml}$	$\frac{C}{mg/100ml}$
1)	0,179			
2)	0,178			
3)	0,180	0,100	0,094	0,090
4)	0,177			
5)	0,180			
	0,178			
1)	0,370			
2)	0,368			
3)	0,365	0,200	0,193	0,203
4)	0,367			
5)	0,369			
	0,367			
1)	0,443			
2)	0,443			
3)	0,450	0,240	0,238	0,201
4)	0,452			
5)	0,457			
	0,449			

METODO DEFINITIVO. **FOFNA**

Con todos los datos obtenidos, adoptamos el método siguiente:

Reactivos:

- Solución de ácido tricloracético al 20 %.
- Solución reciente de nitrito de sodio al 0,1 %.
- Solución de urea al 10 %.
- Solución de sulfanilamidas al 0,1 mg por ml. (ésta solución no debe tener más de una semana de preparada)
- Solución alcohólica de dimetilalanftilamina al 1:100, para ser diluida en el momento de ser usada al 1:250.

Procedimiento:

A 2 ml. de sangre oxalatada le agregamos 13 ml. de agua destilada, esperamos 15^m hasta hemólisis total, y luego gota a gota le agregamos 5 ml. de solución de ácido tricloracético al 20 %, agitamos y filtramos; sobre 10 ml. del filtrado le agregamos 1 ml. de solución de nitrito al 0,1 %, esperamos 10 m. y luego destruimos el exceso de nitrito con solución de urea, que verificamos con papel ozonoscopio; agregamos 5 ml. de solución 1:250 de dimetilalanftilamina y calentamos a 50-60° C. durante 30^m., llevamos a volumen (50 ml.) y leemos en el fotómetro. En caso de realizar la lectura con un colorímetro, conjuntamente con la marcha de las reacciones anteriores, debemos ir preparando, de preferencia dos muestras testigos que difieran en un 50% entre sí; con las soluciones madres de la sulfanilamida que deseamos analizar

Si utilizamos el rotómetro, las absorciones leídas las multiplicamos por la ϵ determinada para cada sustancia, para encontrar la concentración de droga que corresponde o bien buscamos este valor en la curva logarítmica.

Si en vez realizamos la lectura con un colorímetro, debemos recordar, que esta se relaciona con la concentración mediante:

$$C = \frac{a_{\text{Test}}}{\epsilon} \times \text{Conc Test}$$

CONCLUSIONES

Los dosajes hechos en muestras ad hoc, nos comprueban que el control de la droga, realizado por el método de Marshall-Hamonn (5), con las modificaciones hechas por nosotros, es bueno para este tipo de análisis. Cometiéndose errores que oscilan alrededor del 5 %, para la : p-aminobencenesulfonamida; p-aminobencenesulfonacetoamida; p-aminobencenesulfonamidopiridina; p-aminobencenesulfonamidotiazol.

Dosajes en gran cantidad, realizados con el Ulirón (N-4-sulfanil-N-N-dimetilsulfanilamida), nos demostró la imposibilidad de realizar los dosajes con esta técnica, por cuanto no cumple la ley de Beer.

Esto probablemente sea debida a una salificación del grupo sulfónico, con ruptura de la molécula, puesto que obteníamos valores mayores que los que les correspondía por un solo amino grupo diazotable.

Marzo de 1942

BI BLI GRAFIA

Nº	Autor	Revista
1	Marshall	Jour.Amer.Med.Asse.-Mayo 1937-pag 953
2	P.H.Long and Bliss	The Clinical and Experimental use of sulfanilamide, sulfapiridine and allied compound Abril 1939 N.Y.
3	Marshall	Annual Revie. of Biochemistry 1940
4	Brand Marshall	The Jour.Amer.Med.Chem.Soc.-1939.-
5	J.F.Mañquez	Actualidades Médicas.-Dic.1939
6	Rhone-Poulenc	Soc.Parisien d'expan.Chimique.Dagenan. "693" con treinta citas bibliográficas.
7	M.M.Gley.-A.Girard	La Presse Medical.pag 1291 año 1937
8	Pierre Durel	La Presse Medical.-año 1938-pag.1113
9	R.Martin, Panthier, et coll.	La Presse Medical.-año 1940-pag.101
10	H.Niemann	Quimioterapia de las infecciones gonocócicas y estafilocócicas.
11	L.Gattermann-E.Wie- and	Prácticas de Química Orgánica.
12	A.F.Hellemann	Tratado de Química Orgánica.
13	J.A.Sánchez	Química Analítica de Medicamentos Orgánicos
14	E.Hug y F.F.Ludueña	Facultad de Ciencias Médicas Farmacia y R. Ramos Menores.Abr.Jun. 1939-XIX-59
15	M.M.Hartmann	The Jour.of Lab.and Clinical.Medicine.-
16	J.T. Walsh	Photometry.pag.115
17	J.Eggert	Tratado de Química-Física.
18	Marshall	Proc.Soc.Exper.Biol.Med.1937
19	Bratton and Marshall	Jour.Biol.Chem. 1939-pag.128.