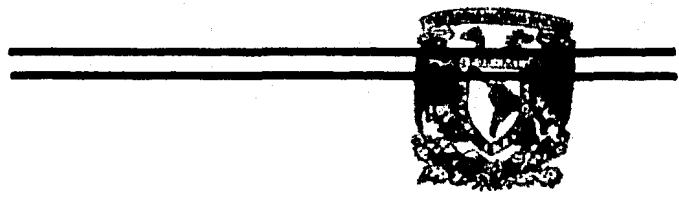


2 Ej. No. 106

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ANTEPROYECTO DE MONOGRAFIA DE GRAMICIDINA PARA
LA FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS
UNIDOS MEXICANOS

T E S I S

EPIGMENTIA SALAZAR GARCIA

QUIMICO

FARMACEUTICO

BIOLOGO



1 9 8 4



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

CAPITULO I - INTRODUCCION: Objetivo del trabajo.

CAPITULO II - GENERALIDADES

CAPITULO III - IMPORTANCIA ECONOMICA

CAPITULO IV - PARTE EXPERIMENTAL: Material y Métodos, Resultados y Conclusiones.

CAPITULO V - MONOGRAFIA QUE SE PROPONE PARA LA FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.

CAPITULO VI - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

CAPITULO I

INTRODUCCION: OBJETIVO DEL TRABAJO

INTRODUCCION

La presente tesis tiene como objeto fundamental proponer un anteproyecto de monografía de "Gramicidina" para ser incluida en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos.

Lo anterior atiende a que la Gramicidina se usa en México en diferentes formas farmacéuticas, tales como soluciones nasales, soluciones oftálmicas, soluciones óticas, cremas, ungüentos y tabletas, fabricados en los diferentes laboratorios del país; así mismo los niveles de producción de 1981-1982 fue de millones de unidades en diferentes formas farmacéuticas equivalentes a un total de ciento sesenta y siete millones de pesos.

El desarrollo de este trabajo se basó en un estudio de la literatura incluyendo diferentes farmacopeas y las experiencias tenidas en la valoración microbiológica que presentaba variaciones estadísticamente significativas, tal como falta de linealidad en las gráficas de concentración Vs. respuesta biológica.

Los métodos reportados hasta la fecha son turbidimétricos y debido a que generalmente estos son afectados por residuos de solventes orgánicos (Kavanah) nos podemos explicar que en parte la variación significativa encontrada, es debida a que la Gramicidina por ser insoluble en agua se recomienda extraer con solventes orgánicos para realizar su análisis (5); por tal motivo en este trabajo experimental se adoptó un método microbiológico por difusión en placa utilizando un método de comparación de 2 + 2 dosis con una relación de concentraciones de 1:5 ya que con éste diferencial pudimos encontrar una correlación lineal en las respuestas a las concentraciones máximas y mínimas. Este sistema de comparación (2 + 2 dosis) fue seleccionado por tener la ventaja de su gran sensibilidad, rapidez, reproducibilidad, precisión y exactitud.

CAPITULO II

GENERALIDADES

HISTORIA

René Dubos nació en Saint-Brice Francia en 1901, estudió Química de los Suelos y Agronomía en Paris. En 1924, fue a Estados Unidos de América y en 1927 obtuvo su doctorado en Fisiología en la Universidad de Rutgers y trabajó durante varios años en el Instituto Rockefeller.

En 1938 Dubos tuvo la idea de utilizar las bacterias del suelo para destruir las bacterias que producen enfermedades en los vegetales o en los mismos suelos. Usando una técnica propia, aisló de un suelo experimental preparado en un pantano sembrado, un bacilo esporógeno gram (+) Bacilo brevis y observó que pudo destruir al Pneumococo. Más tarde logró aislar la sustancia activa que produjo el efecto y la llamó tirotricina. En 1939 obtuvo dos subproductos de la tirotricina a los cuales llamó gramicidina y tirocidina.

La gramicidina es un polipéptido neutro, que siempre se encuentra mezclado con la tirocidina (polipéptido alcalino) y que juntos forman la tirotricina. La gramicidina constituye un 20% en peso de la tirotricina y el 80% lo integra la tirocidina.

Son muy activos contra microorganismos grampositivos y gramnegativos, pero también son altamente tóxicos. Este último factor ha sido en parte disminuido por los farmacéuticos, con la adición de formaldehído.

Además el descubrimiento de Dubos fue fundamental para la historia de los antibióticos ya que fueron los primeros antibióticos que no provienen de un hongo.

Los descubrimientos de Dubos despertaron el interés de Florey y sus colaboradores para continuar las investigaciones y lograr algunos descubrimientos en bacteriología.

Regocijándose acerca del fenómeno natural, Dubos escribió un libro titulado "Hombres, Medicina y Medio Ambiente".

La palabra antibiótico significa "anti-vida", sin embargo estas substancias previenen la salud, y la humilde bacteria o el insignificante hongo, transforman el mundo.

USOS TERAPEUTICOS

La toxicidad sistémica de la Gramicidina limita su uso clínico.

El antibiótico ha sido empleado en tratamiento de úlceras superficiales, heridas, piodermos e infecciones de los ojos, nariz y garganta.

Tiene actividad bacteriana y bacteriostática contra Gram (+). Aplicada sobre la piel o en los ojos, es útil en el tratamiento de infecciones produciendo una baja sensibilización, tópicamente ha sido usada al 0.05 %.

Se usa para aplicación local en el tratamiento de queratoconjuntivitis, ocasionalmente es usada para tratamientos locales en infecciones de la boca y garganta, en heridas, quemaduras, especialmente cuando esta presente el Streptococcus piógenes.

ACTIVIDAD ANTINICROBIANA

La Gramicidina tiene efecto bactericida para muchos microorganismos, por ejemplo:

La Gramicidina es particularmente activa contra bacterias Gram (+) (Pneumococo, Streptococo, Stafilococo, Bacilo de la Difteria, Bacilo esporulado aeróbico, etc.)

La Gramicidina se caracteriza por el espectro antes mencionado, además de inhibir algunos Bacillus Gram (-). La Gramicidina es dos veces más activa que la tirocidina, contra bacterias sensibles a ambos agentes.

MECANISMO DE ACCION

La Gramicidina actúa a través de una función bioenergética alterando la célula bacteriana. Inhibe la fosforilación oxidativa con una fuerte estimulación de consumo de oxígeno en Estafilococo aureus y decrece rápidamente la respiración con una concomitante unión de aminoácidos en el medio en el cual el microorganismo se desarrolla (Carter and Mc Carty, 1966).

EFFECTOS INDESEABLES

La toxicidad de la tirotricina se atribuye principalmente a la acción de la tirocidina. La Gramicidina y tirocidina son potentes agentes hemolíticos, por lo que el antibiótico no debe ser administrado por ninguna ruta que pueda permitir la entrada al torrente sanguíneo; cuando se usa apropiadamente en aplicaciones locales las preparaciones de tirotricina no producen efectos indeseables. La cicatrización de lesiones superficiales no se retrasa y las reacciones de hipersensibilidad son prácticamente desconocidas, en algunas ocasiones, se produce hemólisis cuando la tirotricina es aplicada en intervenciones quirúrgicas recientes o heridas traumáticas.

Las suspensiones de este antibiótico no deben usarse para irrigaciones paranasales y sobre todo cuando están muy próximos a los espacios subaranoideos porque se corre peligro de producir una meningitis fatal. Otras complicaciones serias son la asnomia y paronsmia probablemente debido al daño que le ocasionan a las terminaciones nerviosas inmediatamente después de una aplicación tópica, por ejemplo: en los senos paranasales.

La Gramicidina no es adecuada para administración sistémica, se usa para aplicación local, ya que es altamente tóxica por aplicación intravenosa y causa daño dilatando el hígado y los riñones, es también tóxica a los eritrocitos e inhibe el

crecimiento en cultivo de tejidos (Godman & Gilman).

PREPARACIONES, VIAS DE ADMINISTRACION Y DOSIFICACION

La Gramicidina no actúa por vía oral y, no puede ser administrada parenteralmente se emplea tópicamente en solución o en ungüentos puede también colocarse en las cavidades del cuerpo, siempre y cuando no haya comunicación directa con el torrente sanguíneo, no debe aplicarse en irrigación de fístulas o heridas.

Las preparaciones de Gramicidina son en aerosol, en solución alcohólica y en ungüentos.

Normalmente la concentración del antibiótico es de 0.5 mg/ml. ó 0.5 mg/g. cantidades mayores pueden ser irritantes.

Una dilución apropiada de soluciones comerciales (25 mg/ml), puede hacerse con agua destilada estéril (no con solución de cloruro de sodio) y forma una suspensión coloidal que debe ser preparada diariamente.

CAPITULO III

IMPORTANCIA ECONOMICA

La importancia económica de la Gramicidina puede apreciarse en las tablas 1 y 2 de éste capítulo donde se describen las diferentes preparaciones farmacéuticas producidas por cinco diferentes laboratorios los cuales representan un total de ventas de 2'233 300 unidades equivalentes a \$177'163 159.00 millones de pesos en ventas.

Esta materia prima es importada de Dublin Irlanda, y es la mezcla de cuatro componentes: Gramicidina A, B, C y D, cada una contiene 87.5, 7.1, 5.1, 0.3 % respectivamente.

TABLA No. 1

La siguiente tabla muestra los diferentes medicamentos que contienen Gramicidina la preparación farmacéutica, cantidad de Gramicidina y el laboratorio que la fabrica.

N O M B R E	PREPARADO FARMACEUTICO	CONCENTRACION	PRODUCTOR
BIOTARSON-N	SUSP. NASAL (16 ml)	0.10 mg/ml	IFUSA
BIOTARSON-O	SUSP. ORAL (10 ml)	0.10 mg/ml	IFUSA
GRANAFEX-NASAL	SOL. NASAL (15 ml)	0.05 mg/ml	SOPHIA
GRANBODIN CON BENZOCAINA	PASTILLAS (20)	0.25 mg/past.	SQUIBB
GRANBODIN UNGUENTO	UNGUENTO (14.5g)	0.25 mg/g	SQUIBB
GRANBODIN NASAL C/FENILEFRINA	SOLUCION (15 ml)	0.05 mg/ml	SQUIBB
KENACOMB	CREMA (30 g)	0.025 mg/ml	SQUIBB
NEOSPORIN-O	SOLUCION (10 ml)	0.025 mg/ml	B. WELCOME
POLIXIN OFTENOL	SOLUCION (10 ml)	0.025 mg/ml	SOPHIA
SULNED	SOLUCION (10 ml)	0.025 mg/ml	CRIOFARMA

TABLA No. 2

Relación de las ventas correspondientes a 1982. Período comprendido de septiembre de 1981 a agosto de 1982.

NOMBRE	UNIDADES VENDIDAS	CANTIDAD VENDIDA EN \$
BIOTARSON - N	42 800	2'000 000.00
BIOTARSON - O	157 300	7'000 000.00
GRANAFEX-NASAL	33 400	1'000 159.00
GRANBODIN CON BENZOCAINA	3'733 000	119'000 000.00
GRANBODIN UNGUENTO	38 300	774 000.00
GRANBODIN NASAL C/FENILEFRINA	89 800	1'389 000.00
KENACOMB	93 100	6'000 000.00
NEOSPORIN - O	117 900	5'000 000.00
NEOSPORIN - D	927 700	35'000 000.00
TOTAL	5'233.300	177'163.159.00

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL: Material y Métodos, Resultados y Conclusiones.

El ensayo biológico por el método de análisis de 2 + 2 dosis está basado en la aplicación de dos concentraciones del estándar una concentración alta y una concentración baja y una concentración alta y una concentración baja del problema. De donde se obtendrán los halos de inhibición cuyo diámetro será proporcional a la concentración del antibiótico.

La relación de las dosis sucesivas del problema y del estándar deben ser iguales, asimismo serán iguales el número de observaciones en cada dosis para las dos preparaciones. En este método se utilizan 4 cajas de petri para cada problema en la primera serie de cajas se aplican 4 dosis de estándar (2 altas y 2 bajas) y las 2 concentraciones del problema (la concentración alta y baja) En la segunda serie de cajas se aplican de forma inversa, de esta forma obtendremos 6 resultados para cada una de las concentraciones.

VALORACION DE LA ACTIVIDAD MICROBIOLOGICA DE ANTIBIOTICOS

La eficacia de los antibióticos desde el punto de vista terapéutico, se demuestra por su acción adversa indirecta o directamente sobre microorganismos específicos, bajo condiciones especiales.

Los cambios sutiles debido a la disminución de la actividad antimicrobiana aún no se puede demostrar por cambios químicos, pero sí mediante valoraciones microbiológicas.

Dentro de los métodos microbiológicos existen dos sistemas de mediciones de la relación dosis Vs. respuesta ampliamente difundidos a saber:

I.- Sistemas de difusión en medio de agar, los cuales se basan en la inhibición del desarrollo bacteriano a dos concentraciones conocidas.

II.- Sistema turbidimétrico o de tubo basado en la inhibición de la proliferación bacteriana ante un agente antimicrobiano, característico a diferentes concentraciones dentro de un intervalo conocido.

Al hacer la aplicación del método microbiológico de 2+ 2 dosis, para la valoración de actividad antibiótica de Gramicidina en un ungüento se tuvieron problemas con los tamaños de los halos de inhibición de las dosis altas y bajas; éstos eran muy pequeños y no se encontró correlación entre la dosis y la respuesta obtenida, por lo que se tuvo que desarrollar un nuevo método, tomando en cuenta que la difusión de la Gramicidina a través del agar no era muy buena debido a que el solvente empleado en la preparación de las soluciones no era el adecuado.

Se inició un nuevo estudio de solventes para la Gramicidina, que fueran miscibles con el agua, ya que el medio de cultivo va disuelto en agua y por lo tanto se favorecía la penetración del solvente y al mismo tiempo la del antibiótico. Con este cambio en el método le siguieron los que a continuación se enumeran:

- 1).- La selección del microorganismo que presentara mayor sensibilidad a la Gramicidina y que no fuera inhibido su desarrollo por el disolvente.
- 2).- La selección de las concentraciones alta y baja de Gramicidina con las cuales se tuviera una solución adecuada para que las diferencias en los tamaños de los halos de inhibición de las dos dosis no se sobrepusieran, fueran constantes y representativas.
- 3).- Se estudiaron diferentes diluciones del microorganismo para saber cual nos proporcionaría halos de inhibición definidos y de mejor tamaño.
- 4).- También se probaron diferentes volúmenes de medio para la capa base y la capa con inóculo con los cuales se obtuvieran mejores halos de inhibición.
- 5).- El pH del medio también se modificó para la obtención de mejores resultados.

Para la evaluación de cada uno de los parámetros mencionados se utilizó Gramicidi

na calidad N.F. y, una vez que se desarrolló el método se hicieron determinaciones con materia prima adicionando el placebo y al final se determinó la Gramicidina en un ungüento.

Los principios activos de la formulación eran:

Un esteroide de acción antiinflamatoria

Nistatina

Neomicina

Gramicidina

Excipientes:

Carbonato de propileno

Propilenglicol

Cera de abejas

Petrolato blanco

Los factores que se manejaron y que nos sirvieron de herramientas clave para el desarrollo del método microbiológico para la valoración de la actividad de Gramicidina fueron: entre otros, su solubilidad, la sensibilidad del microorganismo de prueba y el pH del medio, en base a los cuales se hizo la determinación de los siguientes parámetros indispensables para dicha cuantificación:

- a) Concentración del microorganismo de prueba
- b) Relación de concentraciones alta y baja capaz de medir la diferencia de respuesta.
- c) Grosor de la capa base
- d) Grosor de la capa inoculada.

DETERMINACION DE LA SOLUBILIDAD DE GRAMICIDINA

Se determinó la solubilidad de la Gramicidina en diferentes mezclas de agua con diferentes solventes orgánicos, ya que se asume que el agua puede facilitar la difusión del antibiótico en el medio de cultivo y así poder tener la formación de los halos de inhibición del microorganismo por el antibiótico.

Las mezclas utilizadas fueron las siguientes:

Etanol - Agua	(1:1)
Propilenglicol-Etanol-Agua	(4:1:4)
Propilenglicol - Agua	(2:1)
Propilenglicol-Isopropanol-Agua	(1:1:3)
Dimetilsulfóxido-Agua	(1:1)
Dimetilsulfóxido-Agua	(4:1)

La mezcla en donde se obtuvo mejor solubilidad fue la de dimetilsulfóxido-Agua (4:1).

EQUIPO

PERFORADOR DE AGAR

ESPECTROFOMETRO UNICAM SP - 800

INCUBADORA A 37 ± 0.5 °C.

JERINGA HAMILTON DE 100 MICROLITROS DE CAPACIDAD

CUENTA COLONIAS QUEBEC- COUNTER

AGITADOR SUPER - MIXTER (LAB-LINE INST.)

AUTOCLAVE

VERNIER

CAJAS PETRI DE 20 x 100 mm.

ESTUFA

CAMPANA DE FILIJO LAMINAR

MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO PARA ANALISIS DE ANTIBIOTICOS No. 1

LACTOBACILOS - CALDO A.O.A.C.

REACTIVOS

POSFATO DIBASICO DE POTASIO R.A.

POSFATO MONOBASICO DE POTASIO R.A.

CLORURO DE SODIO R.A.

HIDROXIDO DE SODIO R.A.

SULFATO DE SODIO R.A.

CLOROFORMO R.A.

HEXANO R.A.

TETRACLORURO DE CARBONO R.A.
METANOL R.A.
PROPILENGLICOL R.A.
ACETONA R.A.
ETANOL R.A.
ISOPROPANOL R.A.
DIMETIL SULFOXIDO R.A.
SOLUCION SALINA AL 0.9% ESTERIL
SOLUCION AL 2% DE HIDROXIDO DE SODIO
SOLUCION AL 10% DE CLORURO DE SODIO.

SELECCION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA

La selección se hizo de acuerdo a la sensibilidad que presentaron varias cepas de microorganismos frente a la Gramicidina. Se determinó en base a la formación y tamaño de los halos de inhibición.

1).- PREPARACION DEL MICROORGANISMO

- a).- Se sembraron los microorganismos de prueba un día antes del ensayo en un tubo que contenía medio de cultivo apropiado para el crecimiento de los mismos.
- b).- Se inoculó cada medio de cultivo, manteniendo a 48°C con cada uno de los microorganismos correspondientes. Este es el medio de cultivo inoculado.

Los microorganismos probados fueron:

Stafilococcus aureus ATCC 6538

Streptococcus faecalis ATCC 14506
ATCC 10541 y ATCC 8043.

Bacillus - subtilis ATCC 6633

Escherichia coli ATCC 4352

II.- PREPARACION DE LAS CAJAS

Se prepararon series por triplicado para cada microorganismo de prueba de las cuales cada una de las cajas se utilizó para probar las siguientes técnicas:

Caja 1 - Técnica de perforación en agar

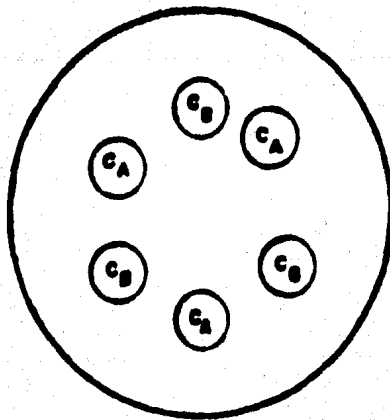
Caja 2 - Técnica de cilindro placa

Caja 3 - Técnica de sensidiscos

- a).- Se esterilizaron 18 cajas petri de vidrio de 100 x 20 mm. por calor seco a 180° C durante dos horas.
- b).- Se distribuyeron uniformemente sobre las cajas, 21 ml. de medio de cultivo para antibiótico No. 1 preparado según indicaciones y se dejó solidificar.

- c).- Sobre la capa basal anterior de cada caja se agregaron 4 ml. de medio de cultivo inoculado con el microorganismo correspondiente S. aureus, St. faecalis, B. substillis, E. coli, manteniendo a 48°C, distribuyéndolos uniformemente en toda la superficie, y se dejaron solidificar.
- d).- Se perforó el agar (la capa base y la capa inoculada) en 6 de las 18 cajas en otras seis cajas se colocaron los cilindros, y en las seis restantes se colocaron los sensibilizadores impregnados en la solución de Gramicidina.
- e).- Se llenaron las perforaciones y los cilindros con las soluciones de Gramicidina como la muestra la figura No. 1

FIGURA No. 1



f).- Se incubaron las placas a 37° C durante 16 a 18 horas.

g).- Al cabo de este lapso de incubación se evaluaron los halos de inhibición que formaron los microorganismos.

TABLA - 3

RESULTADOS

NOMBRE DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA	TECNICA DE LA PREPARACION DE LA PLACA		
	<u>PERFORACION</u>	<u>CILINDRO</u>	<u>SENSIDISCO</u>
<u>Stadilococcus aureus</u> ATCC 6538	+ -	+ -	+ -
<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 14506	+ -	+ -	+ -
<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 10541	+ -	+ -	+ -
<u>Streptococcus faecalis</u> ATCC 8043	+ -	+ -	+ -
<u>Bacillus subtilis</u> ATCC 6633	+ -	+ -	+ -
<u>Escherichia coli</u> ATCC 4352	- -	- -	- -

En donde:

- + = SI presenta halos de inhibición bien definidos
- = NO presenta halos de inhibición
- + = presenta halos de inhibición pequeños y no bien definidos.

El microorganismo que formó los halos de inhibición más claros y con una zona de inhibición de dos terceras partes más grandes que la zona de perforación de medio fue el Streptococcus faecalis ATCC 8043 y también se observó que las cajas preparadas con la técnica de perforación en agar tuvieron halos de inhibición mejor definidos por lo que se concluyó que esta técnica en la que se tenía una mejor difusión de la Gramicidina en el medio de cultivo era la más adecuada para las evaluaciones posteriores.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA

La concentración óptima de la suspensión del microorganismo de prueba se determinó de la manera siguiente:

Se prepararon series de cuatro diferentes concentraciones del microorganismo.

1).- Preparación del microorganismo (St. faecalis ATCC 8043)

El microorganismo de prueba debe conservarse a 5°C, o resembrarlo cada semana

en tubos de ensayo conteniendo 10 ml de medio de cultivo Bacto-Lactobacilli Broth AOAC, esterilizado.

Resiembra - Hacer la resiembra un día antes de que se vaya a usar el microorganismo.

- a). Agitar el tubo que contiene la suspensión del microorganismo.
- b). En condiciones asépticas pasar una azada de la suspensión del microorganismo al tubo que contiene 10 ml. de medio Bacto-Lactobacilli Broth AOAC.
- c). Incubar a 37° C, durante 16 a 18 horas.
- d). Después de este tiempo de incubación, diluir con solución salina, 1 ml. de la suspensión de microorganismos activados de acuerdo a la tabla 4
- e). Leer al espectrofotometro a 650 nm. y registrar los valores de absorbancia, usando como blanco las diluciones correspondientes, sustituyendo el ml de la suspensión del microorganismo, por 1 ml de caldo de Bacto-Lactobacilli AOAC, previamente esterilizado.

TABLA - 4

PREPARACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL MICROORGANISMO.

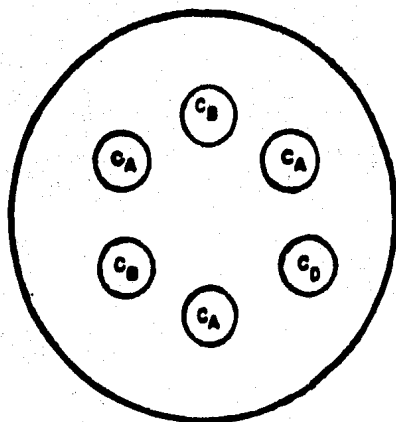
DILUCIONES	SUSPENSION DEL MICROORGANISMO (ML)	SOL. SALINA ESTERIL (ML)	VALORES DE ABSORBANCIA OBTENIDOS A 650 nm.
A	1	14.5	0.143
B	1	11.5	0.170
C	1	9.0	0.220
D	1	6.0	0.282

II.- PREPARACION DE LAS CAJAS

Se prepararon 40 cajas de petri de la misma manera como se hizo en la selección del microorganismo de prueba, utilizando la técnica de perforación en agar.

Se llenaron las perforaciones con 100 mc1 de las soluciones de Gramicidina de 10 mcg/ml y 25 mcg/ml, siguiendo el orden que indica la figura: 2

FIGURA - 2



en donde C_A = concentración alta y C_B = concentración baja.

f).- Tapar las cajas e incubarlas a 37°C, durante 16 a 18 horas.

g).- Medir los halos de inhibición.

RESULTADOS

Se obtuvieron 120 valores de halos de inhibición de la concentración alta y 120 valores de la concentración baja.

Se calcularon los valores promedio para cada dilución.

TABLA - 5

MEDIAS DE LOS DIAMETROS DE LAS ZONAS DE INHIBICION OBTENIDOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL MICROORGANISMO.

DILUCION	PROMEDIO DE HALOS DE INHIBICION PARA:		DIFERENCIA (mm)
	CONC. ALTA 25mcg/ml	CONC. BAJA 10mcg/ml	
A (0.143)	19.17 mm	17.74 mm	1.43
B (0.170)	20.62 mm	18.80 mm	1.82
C (0.220)	20.05 mm	18.65 mm	1.40
D (0.282)	20.57 mm	18.62 mm	1.95

A pesar de que la diferencia no fue la mayor se seleccionó la dilución "A" por presentar los halos mejor definidos para las valoraciones de Gramicidina.

DETERMINACION DEL PH - OPTIMO

1.- Se preparó el microorganismo de prueba de la misma manera que en la determi
nación de la concentración óptima del microorganismo de prueba.

2.- Preparación de los Medios:

Composición del Medio:

Extracto de carne	1.5 g
Extracto de levadura	3.0 g
Casitona	4.0 g
Peptona	6.0 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g

Capa Basal:

- a).- Se pesaron por duplicado 6.1 g de medio cultivo para antibióticos No. 1
- b).- Se rehidrataron con porciones de 200 ml. de agua destilada fría.
- c).- Se calentaron a ebullición para disolverlos completamente.
- d).- Se ajustó uno de los medios de cultivo a un pH de 7.0 y el otro se dejó al pH del medio (6.6 ± 0.1).
- e).- Se esterilizaron en autoclave durante 15 minutos a una atmósfera de pre
sión y 121° C.
- f).- Se prepararon las cajas con este medio de cultivo.

Capa con Inóculo:

- a) se pesaron por duplicado 3.05 g de medio de cultivo para antibióticos No. 1 en un matraz erlenmeyer de 250 ml.
- b) Se rehidrataron en con 100 ml. de agua destilada fría.
- c) Se calentaron a ebullición para disolver el medio completamente.
- d) Se ajustó el medio a pH 7.0 y el otro se dejó igual (pH 6.6) y se esterilizaron.
- e) Se inocularon con dos ml. de la solución preparada con microorganismo.
- f) Se distribuyeron sobre la capa basal 4 ml. de este medio y se dejaron solidificar.
- g) Se hicieron seis perforaciones en cada una de las cajas.

III.- PREPARACION DE LA SOLUCION DE GRAMICIDINA

- a).- Se pesaron 5 mg. de Gramicidina y se pasaron a un matraz volumétrico de 10 ml.
- b).- Se disolvieron en dimetilsulfóxido-agua (80/20) y se aforaron.
- c).- De esta solución se midieron 0.5 ml. y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 ml., se disolvieron y se aforaron con dimetilsulfóxido-agua (80/20). Concentración final 25 mcg/ml.

- d).- Se aplicaron 100 mcl. de esta solución a cada una de las perforaciones, como en los casos anteriores.
- e).- Se incubaron las placas a 37°C, durante 16 a 18 horas.
- f).- Se midieron los halos de inhibición.

RESULTADOS

PROMEDIOS DE LOS HALOS DE INHIBICION DE CADA UNA DE LAS CAJAS EXPRESADOS EN MM.

TABLA - 6

CAJA No.	PROMEDIOS DE LOS HALOS DE INHIBICION EN (MM)	
	pH 6.6	pH 7.0
1	18.20	19.40
2	18.25	19.30
3	18.32	19.45
4	18.35	19.55
5	17.98	19.80
6	18.50	19.97
7	18.41	19.50
8	18.38	19.50

Se obtuvieron diámetros de inhibición más grandes en el medio que tenía pH de 7.0.

GROSOR DE LA CAPA CON INOCULO Y DE LA CAPA BASAL

Con el objeto de afinar un poco más la técnica se probaron algunas variantes en el grosor de la capa basal y de la capa con inoculo.

1.- PREPARACION DE LAS CAJAS

- a).- Se esterilizaron nueve cajas de petri.
- b).- Se distribuyó uniformemente sobre las cajas 25 ml. de medio de cultivo preparado según las indicaciones y se dejó solidificar.

Capa con Inoculo

- c).- Se pesaron 3.05 g. de medio de cultivo para análisis de antibióticos No.1
- d).- Se rehidrataron con 100 ml. de agua destilada fría.
- e).- Se calentaron a ebullición hasta disolverlo.
- f).- Se ajustó el pH a 7.0 y se esterilizó.
- g).- Se inoculo con 2 ml. de la suspensión del microorganismo.
- h).- Se agregaron sobre la capa basal 3.5, 4 y 5 ml. del medio de cultivo inoculado previamente con Streptococcus faecalis ATCC 8043 y se distribuyó uniformemente en toda la superficie y se dejó solidificar.

- i).- Se hicieron seis perforaciones de la capa inoculada y la capa base en cada una de las cajas.

Cambios en la Capa Basal

- a).- Se prepararon cajas de petri de vidrio previamente esterilizadas y se les adicionó 23, 24 y 25 ml. de medio de cultivo para análisis de antibióticos No. 1 a tres cajas para cada volumen de capa basal, y se dejaron solidificar.
- b).- Se agregaron sobre cada una de las cajas con la capa basal, 4 ml. de medio de cultivo previamente inoculado con St. faecalis ATCC 8043, y se distribuyeron uniformemente en toda la superficie y se dejaron solidificar.
- c).- Se hicieron las perforaciones en las cajas.

III.- SE PREPARO LA SOLUCION DE GRAMICIDINA A LA CONCENTRACION DE 25 MCG/ML.

RESULTADOS

- 1).- En las cajas, en las cuales se variaron las capas basales no se observó cambio alguno en el desarrollo del microorganismo o en los halos de inhibición.
- 2).- En cambio al hacer las variaciones en los volúmenes de la capa con inóculo se obtuvieron halos de inhibición no definidos o demasiado pequeños, y en las cajas que contenían 4 ml. de medio inoculado se observaron zonas de inhibición de tamaño adecuado.

SELECCION DE LAS CONCENTRACIONES ALTA Y BAJA DE GRAMICIDINA

Para encontrar las concentraciones de Gramicidina alta y baja más adecuadas, con las cuales se tendrían diferencias significativas en los tamaños de los diámetros de las zonas de inhibición, se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones de Gramicidina 5, 10, 15, 20 y 25 mcg/ml.

Se prepararon las cajas con los medios base e inoculado de la manera descrita anteriormente.

1.- PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE GRAMICIDINA

- a).- Se pesaron 5.0 mg. de Gramicidina y se pasaron a un matraz volumétrico de 100 ml.
- b).- Se disolvieron en dimetilsulfóxido-agua (80/20) y se aforaron al volumen.
- c).- De esta solución se efectuaron las siguientes diluciones.

TABLA - 7

SOLUCION DE GRAMICIDINA (500 mcg/ml)	ALFORO CON DMSO 80/20 (ml)	CONCENTRACION OBTENIDA (mcg / ml)
0.1	10	5
0.2	10	10
0.3	10	15
0.4	10	20
0.5	10	25

d).- Se aplicaron 100 mcl. de cada una de las concentraciones de la solución de Gramicidina para cada caja, como indica la figura, y se taparon las cajas cuidadosamente.

La perforación No. 6 se llenó con DMSO-Agua (80/20) como blanco.

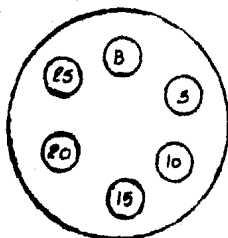


FIGURA No. 3

e).- Se incubaron las placas a 37°C durante 16 a 18 horas.

f).- Se midieron los diámetros de las zonas de inhibición.

g).- Se sumaron los 15 datos obtenidos para cada concentración y se calcularon las medias aritméticas.

h).- Se graficaron los resultados obtenidos formando una línea recta.

(Gráfica No. 4)

RESULTADOS

TABLA - 8

CONCENTRACION DE GRAMICIDINA (MCG/ ML)	PROMEDIO DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION (MM)
5	16.93
10	17.92
15	18.51
20	18.98
25	19.30

De donde se consideró que la diferencia de 2.37 mm, correspondiente a las concentraciones de 5 y 25 mcg/ml, era la más adecuada.

FACTORES SELECCIONADOS PARA EL METODO MICROBIOLÓGICO DE 2 + 2 DOSIS PARA LA
VALORACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GRAMICIDINA.

- 1.- El sistema de solventes que facilitó la difusión de la Gramicidina fue:
Dimetilsulfóxido-Agua (80/20).
- 2.- El microorganismo de prueba más sensible a la Gramicidina y que presentó mejores halos de inhibición fue: Streptococcus faecalis ATCC 8043.
- 3.- La técnica de perforación también facilitó la difusión del antibiótico formando halos de inhibición definidos y de tamaño adecuado.
- 4.- La concentración óptima del microorganismo de prueba fue por cada 100 ml. de medio de cultivo 2 ml. de una suspensión del microorganismo, diluída 1 en 14.5 ml. de solución salina, ajustando a una densidad óptica de 0.143 ± 0.005 a una longitud de onda de 650 nm.
- 5.- Las concentraciones alta y baja del antibiótico fueron de 5 y 25 mcg/ml.
- 6.- El grosor de la capa base no afectó el tamaño del halo de inhibición. En cambio el grosor de la capa con inóculo quedó establecida en 4 ml.
- 7.- El pH que favoreció el tamaño de la zona de inhibición fue de 7.0.

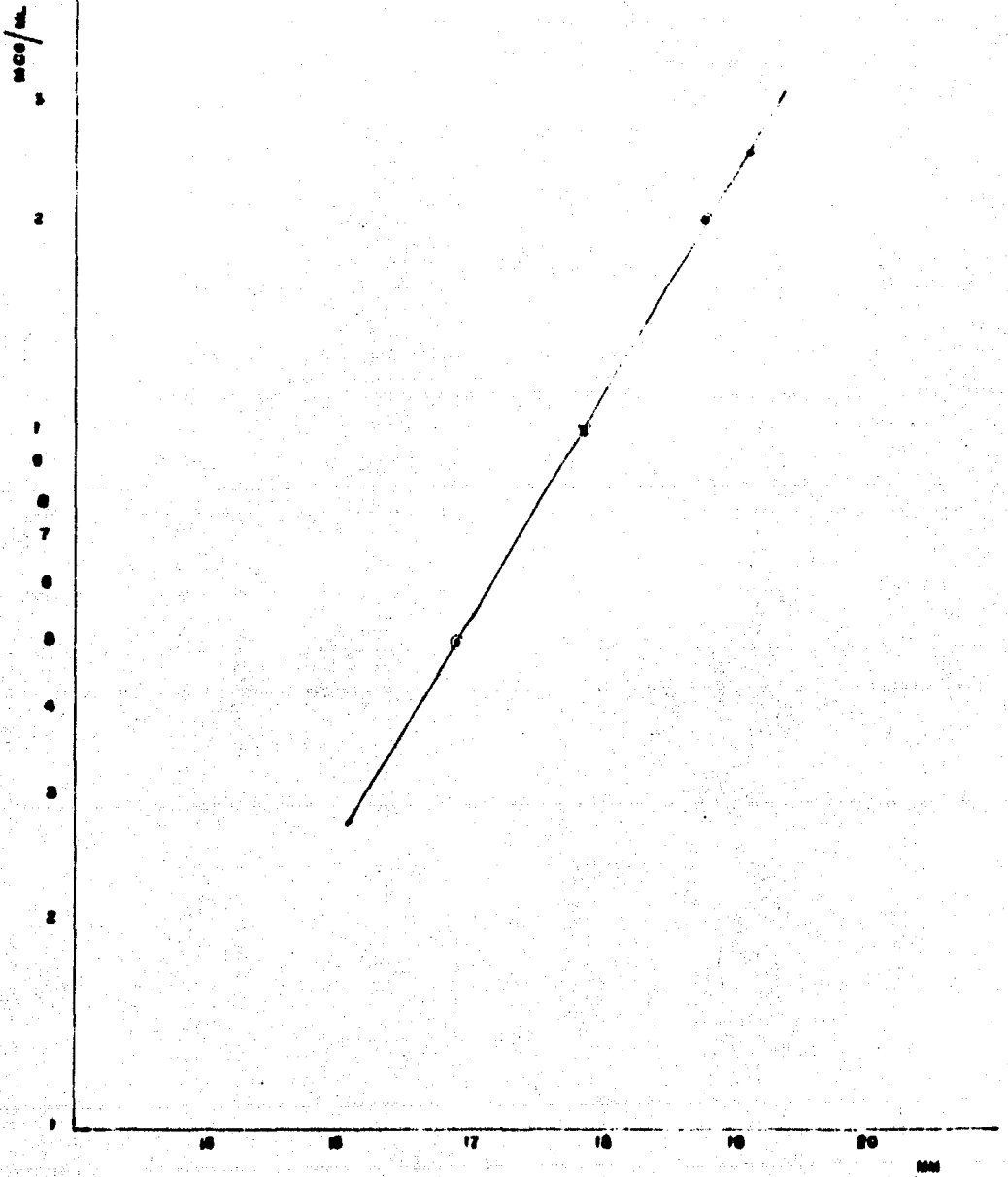
Una vez definidas todas las variantes se volvió a probar el método con materia prima para lo cual se prepararon cajas de petri de acuerdo al método desarrollado y se hicieron recobros utilizando materia prima de Gramicidina, en cinco diferentes concentraciones 5, 10, 15, 20 y 25 mcg/ml. de donde se obtuvieron 50 resultados para cada una de las concentraciones (gráfica No. 1). Haciendo una comparación de las medidas de los halos de inhibición para cada concentración Tabla 9 con los medias de la tabla 8, estos son bastantes similares por lo que se demuestra que hay reproducibilidad en el método.

TABLA - 9
RESULTADO DE 5 CONCENTRACIONES DE GRAMICIDINA COMO MATERIA PRIMA

No. DE MUESTRA	CONCENTRACIONES				
	5 mcg/ml DIAMETRO EN MM.	10 mcg/ml DIAMETRO EN MM.	15 mcg/ml DIAMETRO EN MM.	20 mcg/ml DIAMETRO EN MM.	25 mcg/ml DIAMETRO EN MM.
1	16.90	17.80	18.35	18.75	19.15
2	16.90	17.80	18.35	18.75	19.15
3	16.90	17.80	18.32	18.75	19.15
4	16.90	17.80	18.32	18.75	19.20
5	16.93	17.94	18.32	18.85	19.10
6	16.93	17.94	18.25	18.85	19.10
7	16.93	17.90	18.25	18.81	19.10
8	16.94	17.90	18.25	18.81	19.10
9	16.94	17.82	18.45	18.81	19.16
10	16.93	17.82	18.45	18.76	19.20
11	16.93	17.82	18.37	18.76	19.00
12	16.90	17.91	18.49	18.76	19.00
13	16.90	17.91	18.38	18.83	19.00
14	16.90	17.96	18.38	18.83	19.00
15	16.90	17.96	18.38	18.83	19.04
16	16.95	17.96	18.50	18.80	19.02
17	16.95	17.96	18.50	18.80	19.02
18	16.95	17.86	18.42	18.80	19.20
19	16.95	17.87	18.30	18.79	19.10
20	16.95	17.87	18.42	18.79	19.10
21	16.87	17.89	18.48	18.79	19.10
22	16.87	17.89	18.48	18.80	19.10
23	16.87	17.90	18.48	18.85	19.05
24	16.85	17.90	18.55	18.85	19.05
25	16.85	17.85	18.55	18.85	19.05
26	16.85	17.85	18.42	18.85	19.02
27	16.85	17.85	18.24	18.84	19.20
28	16.93	17.85	18.24	18.84	19.20
29	16.90	17.94	18.35	18.84	19.20
30	16.92	17.94	18.55	18.80	19.08
31	16.92	17.94	18.35	18.80	19.08
32	16.92	17.94	18.36	18.80	19.08
33	16.87	17.86	18.40	18.80	19.10
34	16.87	17.91	18.40	18.81	19.10
35	16.87	17.91	18.40	18.81	19.10
36	16.90	17.87	18.40	18.80	19.10
37	16.90	17.87	18.42	18.80	19.05
38	16.90	17.86	18.39	18.80	19.05
39	16.90	17.86	18.39	18.79	19.05
40	16.86	17.89	18.39	18.79	19.00
41	16.86	17.89	18.55	18.77	19.00
42	16.86	17.82	18.55	18.83	19.00
43	16.86	17.82	18.55	18.75	19.20
44	16.88	17.86	18.42	18.75	19.15
45	16.88	17.86	18.50	18.77	19.10
46	16.88	17.90	18.50	18.77	19.10
47	16.94	17.90	18.38	18.77	19.10
48	16.94	17.88	18.38	18.80	19.10
49	16.90	17.88	18.38	18.80	19.15
50	16.90	17.88	18.40	18.80	19.15

GRAFICA No. 1

GRAFICA DE LAS MEDIDAS DE 50 RESULTADOS DE GRAMICIDINA MATERIA PRIMA + LACEBO: EN 5 CONCENTRACIONES (5 MCG/ML = 18.90 MM., 10MCG/ML = 17.88 MM, 15 MCG/ML = 18.40 MM, 20 MCG/ML = 18.80 MM, 25 MCG/ML = 19.10MM.)



Las desviaciones estándar y los valores de los medias para cada concentración son:

TABLA 10

CONCENTRACION	σ	\bar{x}
5 mcg/ml	0.3146	16.90
10 mcg/ml	0.046	17.88
15 mcg/ml	0.0841	18.40
20 mcg/ml	0.0312	18.80
25 mcg/ml	0.0635	19.10

Como se observan son muy pequeños lo cual nos demuestra que el método es válido. El factor de correlación es de 0.967, y nos dice que los resultados presentan una linealidad adecuada.

El intervalo de confianza es:

para 5 mcg/ml $IC_{95\%} = \frac{0.3146 \times 2.01}{50} = 0.08943$
 16.90 ± 0.08943 ; límites 16.989 - 16.810

para 10 mcg/ml $IC_{95\%} = \frac{0.046 \times 2.01}{50} = 0.013076$
 17.88 ± 0.013076 ; límites 17.893 - 17.867

para 15 mcg/ml $IC_{95\%} = \frac{0.0841 \times 2.01}{50} = 0.02391$
 18.40 ± 0.02391 ; límites 18.424 - 18.376

para 20 mcg/ml $IC_{95\%} = \frac{0.0312 \times 2.01}{50} = 0.00887$
 18.80 ± 0.00887 ; límites 18.801 - 18.791

para 25 mcg/ml $IC_{95\%} = \frac{0.0635 \times 2.01}{50} = 0.01805$
 19.10 ± 0.01805 ; límites 19.118 - 19.082

El factor de student para 49 grados de libertad a 0.05 de probabilidad es 2.01

Para cumplir con uno de los objetivos al desarrollar el método microbiológico, la valoración de la potencia antibiótica de la Gramicidina en un ungüento, se efectuó el análisis en el producto obteniendo 50 valores para la concentración baja (5 mcg/ml) y 50 valores para la concentración alta 25 mcg/ml.

<u>No. DE MUESTRA</u>	<u>ESTANDAR 5 MCG/ML</u>	<u>ESTANDAR 25 MCG/ML</u>	<u>UNGÜENTO 5 MCG/ML</u>	<u>UNGÜENTO 25 MCG/ML</u>
1	16.88	19.15	16.57	19.15
2	16.80	19.20	16.32	18.95
3	16.80	19.20	16.16	18.95
4	16.80	19.20	16.17	18.95
5	16.65	19.20	16.61	18.80
6	16.65	19.15	16.61	19.20
7	16.65	19.15	16.63	19.40
8	16.65	19.22	16.60	19.15
9	16.51	19.22	16.60	19.15
10	16.51	19.22	16.61	19.05
11	16.55	19.10	16.82	18.98
12	16.55	19.10	16.82	19.41
13	16.45	19.15	16.80	18.85
14	16.45	19.25	16.83	18.98
15	16.45	19.25	16.78	18.98
16	16.48	19.25	16.79	19.20
17	16.48	19.25	16.80	19.20
18	16.48	19.15	16.79	19.20
19	16.60	19.15	16.83	18.90
20	16.60	19.15	16.85	18.95
21	16.66	19.20	16.83	18.90
22	16.66	19.20	16.82	19.43
23	16.66	19.20	16.82	19.41
24	16.70	19.20	16.85	19.45
25	16.70	18.95	16.84	19.45
26	16.70	18.95	16.84	19.15
27	16.65	18.95	16.61	19.15
28	16.45	19.10	16.63	18.85
29	16.45	19.10	16.46	18.95
30	16.45	19.10	16.47	18.90
31	16.55	19.10	16.82	19.43
32	16.55	19.17	16.80	19.40
33	16.55	19.17	16.80	19.15
34	16.55	19.17	16.85	19.15
35	16.60	19.25	16.85	19.40
36	16.60	19.25	16.85	19.40
37	16.60	19.25	16.85	18.80
38	16.60	18.95	16.78	18.95
39	16.51	18.95	16.78	19.40
40	16.51	18.95	16.80	18.85
41	16.51	19.15	16.80	18.98
42	16.50	19.15	16.80	19.45
43	16.50	19.20	16.16	18.95
44	16.58	19.20	16.16	18.95
45	16.58	19.20	16.61	18.95
46	16.58	19.22	16.78	18.98
47	16.71	19.27	16.79	18.98
48	16.71	19.25	16.80	19.45
49	16.72	19.25	16.80	19.20
50	16.71	19.25	16.80	19.45

Valores estadísticos de las 50 lecturas de los halos de inhibición desarrollados al analizar el ungüento.

TABLA 12

CONCENTRACION DE GRAMICIDINA	MEDIA \bar{x}	σ	IC _{95%}	LIMITES	ERROR
5 mcg/ml STD	16.596	0.10679	0.0303	16.703-16.566	0.015
25 mcg/ml STD	19.159	0.0899	0.0255	19.184-19.133	0.0127
5 mcg/ml ungüento	16.717	0.1345	0.0382	16.755-16.679	0.019
25 mcg/ml ungüento	19.126	0.2137	0.0607	19.187-19.065	0.0302

RESULTADOS

1.- Si graficamos los resultados obtenidos para el unguento sobre la línea obtenida de la gráfica de las cinco concentraciones de materia prima de Gramicidina, vemos que estos quedan exactamente en la recta por lo que concluimos que es lineal.

2.- La evaluación estadística del método microbiológico de 2 + 2 dosis a través de los resultados nos indica que:

T A B L A 13

CONCENTRACIONES	MATERIA PRIMA			UNGUENTO		
	MCG / ML	σ	IC 95%	ERROR	σ	IC 95%
5	0.3146	0.08943	0.0445	0.1345	0.0382	0.019
25	0.0635	0.01805	0.00898	0.2137	0.0607	0.0302

También se hicieron recobros con 375 mcg y 275 mcg de materia prima de gramicidina con el mismo fin de verificar la reproducibilidad del método. Con los valores obtenidos se evaluó estadísticamente el método.

TABLA - 14

MCG DE GRAMICIDINA AGREGADOS	MCG DE GRAMICIDINA RECUPERADO	% DE RECUPERACION
375	375.0	100.00
375	378.7	101.00
375	364.0	97.00
375	390.5	104.00
375	376.8	100.48
375	374.6	99.89
375	371.2	99.00
375	371.2	99.00
375	386.0	103.00
375	375.7	100.19
275	262.8	95.56
275	270.7	98.44
275	269.7	98.07
275	279.0	101.00

En donde:

$$\bar{x} = 99.76 \text{ y } (\bar{x})^2 = 9\,952.06$$

y la desviación estándar es:

$$\sigma = 2.21$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

El intervalo de confianza de la media al 95% de probabilidad es:

$$IC_{95\%} = \frac{\sigma \times \text{factor de } t}{\sqrt{n}} = \frac{2.21 \times 2.16}{\sqrt{14}}$$

$$IC_{95\%} = \frac{2.21 \times 2.16}{3.74} = 1.28$$

Nota: El factor de t para 14 es de 2.16 (en tablas $t_{0.475} = 2.16$)

por lo tanto el método es válido.

$$(t)_c = \frac{\bar{x} - A}{\frac{s}{\bar{x}}}$$

$$\hat{s}^2 = \frac{n}{n-1} \left[\frac{\sum x^2}{n} - (\bar{x})^2 \right]$$

$$\hat{s}^2 = \frac{14}{13} \left[\frac{139388}{14} - 9\,952.06 \right]$$

$$\hat{s}^2 = 1.077 [9\ 956.29 - 9\ 952.06]$$

$$\hat{s}^2 = 4.556$$

$$\hat{s} = \sqrt{s}$$

$$\hat{s} = \sqrt{4.556}$$

$$\hat{s} = 2.13$$

$$\frac{\hat{s}}{\bar{x}} = s/\sqrt{n}$$

$$\frac{\hat{s}}{\bar{x}} = 2.13 / \sqrt{14}$$

$$= 2.13 / 3.74$$

$$= 0.51$$

$$(t)_c = \frac{99.76-100}{0.51} = 0.47$$

Si t de muestrases MAYOR que t de tablas RECHAZAR.

ERROR:

$$= \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{2.21}{\sqrt{14}} = \frac{2.21}{3.7} = 0.6$$

$$99.76 \pm 1.28 \text{ limites de } 101.04 - 98.48$$

Existirá el 95% de probabilidad que un resultado sea verdadero si cae dentro de esos límites.

Otras concentraciones a los que se trabajó para verificar con el método fueron a 5 mcg/ml como dosis baja y 15 mcg/ml como dosis alta.

Los resultados demuestran que el tamaño de los halos se conserva en la misma proporción que cuando se hicieron determinaciones con las 5 dosis (5, 10, 15, 20 y 25 mcg/ml). (Ver tabla anexa).

Los valores para la media y la desviación estándar son:

TABLA 15

VALORES ESTADÍSTICOS	PROBLEMA BAJO	ESTANDAR BAJO	PROBLEMA ALTO	ESTANDAR ALTO
\bar{x}	16.19	16.16	18.15	18.20
σ	0.0282	0.0115	0.0115	0.0100

Los valores de las desviaciones estándar son muy pequeños por lo que se confirma la validez del método.

TABLA 16

Resultado de 50 medias de los halos de inhibición de problema y estándar.

PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICION DEL PROBLEMA EN MM.	PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICION DEL ESTANDAR EN MM.	DIFERENCIAS ENTRE EL ESTANDAR Y EL PROBLEMA EN MM.
P_A 18.15	E_A 18.20	0.05
P_B 16.19	E_B 16.16	0.03

En donde:

P_A = Problema Alto

P_B = Problema Bajo

E_A = Estándar Alto

E_B = Estándar Bajo

Las diferencias en el tamaño de los halos entre estándar alto y estándar bajo y problema alto y problema bajo son:

$$P_A - P_B = 2.04 \text{ mm.}$$

$$E_A - E_B = 1.96 \text{ mm.}$$

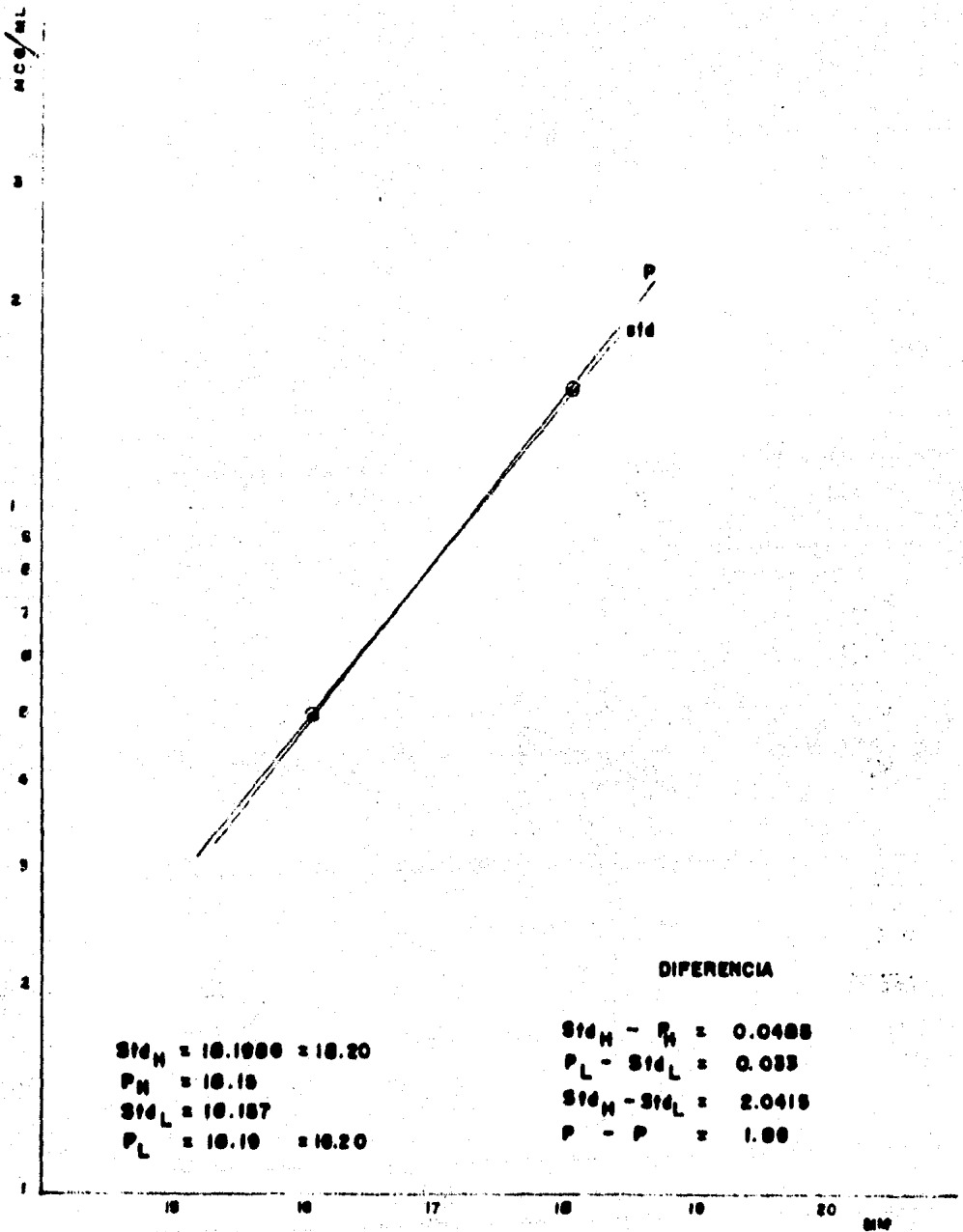
Los valores que se obtuvieron para las dos concentraciones son constantes y se mantiene la uniformidad en los resultados.

TABLA - 17

RESULTADO DE 50 LECTURAS PARA ESTANDAR Y PROBLEMA (UNGUENTO) EN LAS CONCENTRACIONES DE 5 y 15 MCG/ML

<u>PROBLEMA BAJO (MM)</u>	<u>ESTANDAR BAJO (MM)</u>	<u>PROBLEMA ALTO (MM)</u>	<u>ESTANDAR ALTO (MM)</u>
16.20	16.17	18.13	18.21
16.15	16.16	18.14	18.21
16.25	16.17	18.14	18.21
16.18	16.16	18.17	18.20
16.19	16.15	18.15	18.20
16.20	16.15	18.15	18.20
16.16	16.15	18.15	18.18
16.22	16.14	18.15	18.18
16.19	16.14	18.15	18.18
16.19	16.16	18.15	18.21
16.20	16.16	18.14	18.21
16.18	16.16	18.17	18.21
16.16	16.16	18.13	18.19
16.22	16.14	18.13	18.19
16.18	16.17	18.15	18.20
16.20	16.16	18.15	18.20
16.15	16.16	18.16	18.20
16.25	16.15	18.16	18.20
16.17	16.17	18.17	18.20
16.21	16.14	18.17	18.20
16.17	16.14	18.17	18.19
16.17	16.15	18.14	18.19
16.18	16.17	18.14	18.19
16.18	16.15	18.15	18.19
16.20	16.17	18.15	18.20
16.20	16.17	18.15	18.21
16.21	16.16	18.15	18.18
16.21	16.16	18.13	18.18
16.25	16.16	18.16	18.20
16.25	16.16	18.14	18.19
16.25	16.16	18.15	18.20
16.25	16.14	18.15	18.20
16.19	16.15	18.15	18.20
16.17	16.17	18.14	18.18
16.21	16.16	18.14	18.18
16.19	16.17	18.14	18.21
16.19	16.15	18.14	18.21
16.17	16.16	18.15	18.20
16.20	16.16	18.15	18.21
16.17	16.16	18.15	18.20
16.18	16.16	18.15	18.21
16.21	16.16	18.17	18.21
16.20	16.17	18.17	18.20
16.20	16.17	18.14	18.20
16.20	16.17	18.14	18.21
16.20	16.17	18.14	18.21
16.16	16.14	18.16	18.20
16.16	16.14	18.16	18.20
16.16	16.14	18.16	18.20
16.16	16.14	18.16	18.20
16.16	16.14	18.16	18.20
16.16	16.15	18.16	18.20

GRAFICA No.2



$Std_H = 16.1988 \approx 16.20$
 $P_H = 16.18$
 $Std_L = 16.187$
 $P_L = 16.10 \approx 16.20$

DIFERENCIA

$Std_H - P_H = 0.0488$
 $P_L - Std_L = 0.033$
 $Std_H - Std_L = 2.0418$
 $P - P = 1.00$

RESUMEN

La aplicación del método microbiológico de 2 + 2 dosis de difusión en placa por perforación para la cuantificación de Gramicidina en unguento, se basa en una serie de extracciones para la separación de ésta de los demás componentes activos y excipientes de la formulación.

Posteriormente se evaporan los solventes de extracción y se hace la recuperación en el disolvente para la aplicación de la Gramicidina en las perforaciones efectuadas en el medio de cultivo de cada caja de petri, con el cual se obtuvo una buena difusión del antibiótico a través del agar, logrando así la inhibición del desarrollo de los microorganismos, marcando las zonas de no crecimiento para la cuantificación de la potencia del antibiótico.

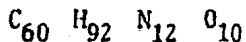
Con los resultados obtenidos de las medias de las zonas de inhibición se hicieron las evaluaciones estadísticas.

Así mismo se hizo una extensa recopilación de datos teóricos y prácticos de las propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas y biológicas de la Gramicidina para la monografía.

CAPITULO V

**MONOGRAFIA QUE SE PROPONE PARA LA FARMACOEPIA
NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.**

c).- Fórmula Condensada



d).- Peso Molecular

Gramicidina Soviética: 1 141.49

Gramicidina Dubos : alrededor de 2000

e).- Descripción

Polvo cristalino, blanco o casi blanco, inodoro.

f).- Solubilidad

Soluble en alcohol e insoluble en agua.

g).- Ensayos de Identidad

La absorbencia de una solución 1 en 20 de Gramicidina en alcohol determinada en una celda de 1 cm. a una longitud de onda de 440 m μ usando un espectrofotómetro apropiado, no excede de 0.096.

Formación de clorhidrato de Gramicidina.-

Recristaliza en forma de prismas en etanol-ácido clorhídrico diluido. Este se descompone a 277° - 278°C y tiene una rotación óptica de $[\alpha]_D^{24}$ - 289° a una concentración de 0.43 g/100 ml. en etanol al 70% es libremente soluble en alcohol, ligeramente soluble en acetona, prácticamente insoluble en agua, ácidos y álcalis.

h).- Pérdida al secado

NO MAS DE 3 %

Transferir alrededor de 100 mg. de la muestra en un pesafiltro secado y pesado previamente. Secar en una estufa a vacío inclinando a un lado la tapadera del pesafiltros durante el período de secado. Secar a una temperatura de 60° y a una presión de 5 mm. de mercurio durante un tiempo no menor a tres horas. Al final del período de secado, reemplazar el vacío de la estufa con aire seco pasado a través de un agente secante tales como ácido sulfúrico o sílica gel. Colocar la tapadera en su lugar y poner el pesafiltro en un desecador sobre un agente desecante tales como pentóxido de fósforo o sílica gel, dejar enfriar a temperatura ambiente y volver a pesar, calcular el porcentaje de pérdida.

i).- Residuo de Ignición

NO MAS DE 1.0 %

j).- Punto de Fusión

229° - 230° C después de haber sido secada.

k).- Prueba de Seguridad

1.- Animal de Prueba

Usar ratones albinos que no hayan sido usados previamente y mantenidos a una dieta controlada de comida y agua.

El día de la prueba usar aquellos ratones que tengan un peso no menor de 18 g y no mayor de 25 g. Durante la prueba cada grupo de ratones a los que se les ha administrado la muestra deberán ser colocados en una caja con las instalaciones necesarios y recibirán comida y agua, el medio ambiente deberá mantenerse a una temperatura constante en cualquier época del año.

2).- Preparación y administración de las soluciones.

Diluyente: Goma de acacia.-

Disolver 10g. de goma de acacia en aproximadamente 50 ml. de agua destilada. Dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente y diluir a 100 ml. con agua destilada. Filtrar a través de algodón. Almacenar en refrigeración.

Preparar la muestra utilizando el diluyente mencionado para tener una concentración final de 5 mg/ml.

3).- Procedimiento

Usar jeringas de vidrio y agujas estériles No.26 y 1½ pulg. de longitud. A cada uno de 5 ratones administrar intraperitonealmente 0.5 ml. de la solución.

4).- Evaluación

Observe los ratones por 48 horas, si ningún animal muere en el período de observación, el antibiótico pasa la prueba de seguridad. Si uno o más ani-

males mueren el período de observación repetir la prueba una o más veces usando para cada prueba 5 ratones que no se han usado previamente, con un peso de 20 g (\pm 0.5 g). Si el número total de animales muertos incluyendo la prueba original no excede el 10% se considera que el antibiótico pasa la prueba de seguridad.

METODO MICROBIOLOGICO PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE GRAMICIDINA POR

2 + 2 DOSIS

Preparación de la muestra patrón de Gramicidina

Pesar con exactitud aproximadamente 62.5 mg. de Gramicidina en un matraz volumétrico de 100 ml. disolver en dimetilsulfóxido y aforar (concentración 0.625 mg/ml) De esta solución medir 1 ml. y transferirlo a un matraz volumétrico de 25 ml aforar con una mezcla de dimetilsulfóxido-agua (4:1). Esta solución corresponde a la dosis alta de la solución patrón (concentración 25 mcg/ml). Medir 2 ml de la solución anterior y llevarlos a un matraz volumétrico de 10 ml. aforar con la mezcla, ésta solución corresponde a la dosis baja de la solución patrón (concentración 5 mcg/ml).

Preparación del microorganismo de prueba:

Conservar el microorganismo de prueba (*Streptococcus faecalis* ATCC 8043) a 5° C o resebrándolo cada semana en tubos de ensayo conteniendo 10 ml. de medio de cultivo Bacto Lactobacilli Broth AOAC. Sembrar una azada en un tubo con inóculo reciente e incubar a 37° C de 12 a 18 horas aproximadamente.

Colocar 18 ml. de solución salina estéril al 0.9% en un matraz erlenmeyer de 125 ml. estéril, adicionar 3 ml. de la suspensión del microorganismo de prueba y ajus

tar a una densidad óptica a 0.143 ± 0.05 , a una longitud de onda de 650 nm. contra un blanco preparado de igual forma que el inóculo, usando el medio de cultivo en lugar de la suspensión del microorganismo. Con esta suspensión inocular a una concentración de 2%, el medio de cultivo Antibiótic Medium No. 1, esterilizado y enfriado a 48° C, manteniéndolo a esta temperatura para evitar que solidifique.

Preparación de las Cajas

Utilizar 4 cajas para cada problema.

1).- Esterilización de las cajas de petri:

Esterilizar por calor seco a 180° C durante dos horas, 10 cajas petri de vidrio.

2).- Preparación de las cajas con los medios de cultivo:

a.- Distribuir uniformemente sobre cada una de las cajas 25 ml. de medio de cultivo para antibiótico No. 1, preparado y esterilizado de acuerdo a las indicaciones, esperar a que solidifique.

b.- Agregar sobre el medio de cultivo ya solidificado 4 ml. de medio de cultivo para antibióticos No. 1 a 48° , previamente esterilizado e inoculado con Streptococcus faecalis ATCC 8043, como se indicó anteriormente; distribuyéndolos uniformemente en toda la superficie, dejar que solidifique. Es importante que la capa inoculada se deje reposar durante 20 minutos para que solidifique, ya que de esto depende el que obtengamos perforaciones con bordes bien contorneados.

c.- Una vez que ha solidificado el medio inoculado se procede a hacer seis perforaciones de la capa base y la capa inoculada, en cada una de las cajas con un perforador de agar de tal manera que cada perforación se

encuentre a intervalos de 60° formando un hexágono regular, cuidando que queden perfectamente contorneados los bordes.

d.- Llenar las perforaciones con 100 mcl de las concentraciones altas y bajas de las soluciones problema y patrón de Gramicidina con una microjeringa Hamilton's de acuerdo a la siguiente figura.

e.- Tapar las cajas de petri y llevar las placas a la estufa de incubación, evitar cualquier derrame de la solución, ya que puede originar zonas de respuesta irregular.

f.- Incubar las placas durante 16 a 18 horas a 37°C.

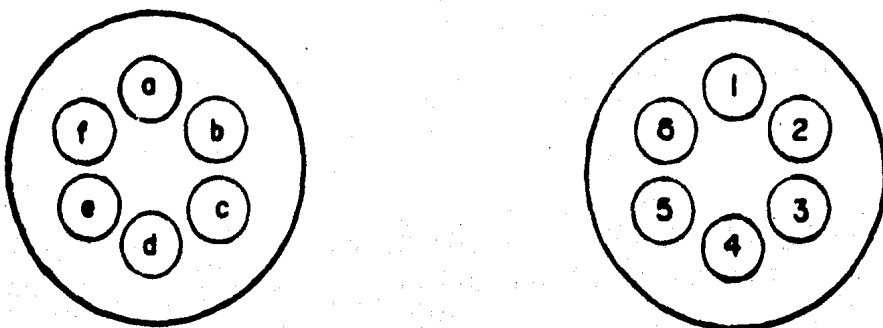


FIGURA - 4

a, b, 1 - concentración baja de la solución patrón (5 mcg/ml)

e, d, 4 - concentración alta de la solución patrón (25 mcg/ml)

c, 2, 3 - concentración baja de la solución problema

f, 5, 6 - concentración alta de la solución problema

Efectuar los cálculos en base a las siguientes fórmulas para el método de 2 + 2 dosis.

$$A = (S_a + S_b) - (P_a + P_b)$$

$$B = (S_a + P_a) - (S_b + P_b)$$

En donde:

S_b = Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondientes a las dosis menor de la solución patrón.

S_a = Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondientes a las dosis mayor de la solución patrón.

P_b = Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondiente a la dosis menor de la solución problema.

P_a = Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondiente a la dosis mayor de la solución problema.

Nota: En el caso en que la suma de los promedios de las zonas de inhibición del problema sea menor que la del patrón, se invierten los términos de la ecuación para que "A" tenga un valor positivo.

Después de obtener el valor de A y B, determinar la relación de actividades (R) con la siguiente fórmula:

R = Antilog. de M

M = Log D x (A/B)

En donde: M = A/B Log $\frac{\text{Dosis alta del patron}}{\text{Dosis baja del patron}}$

Log 5 = 0.699

Por lo tanto M = 0.699 (A/B)

Los microgramos de Gramicidina por gramo de unguento se calculan de la siguiente manera:

$$\text{mcg/g} = \frac{R \times C \times F}{P_m}$$

Donde : C = Dosis mayor de la solución patrón en mcg/ml

F = Factor de dilución correspondiente a la dosis mayor de la solución problema.

P_m = Peso de la muestra expresado en gramos.

Nota: Cuando los promedio de las zonas de inhibición del problema sean menores que los del patrón, es decir cuando se inviertan los términos de la ecuación para obtener un valor positivo de A, deberá usarse el recíproco (1/R de la relación de actividades en la última fórmula).

Usos.

Se usa en el tratamiento de úlceras superficiales, en infecciones de los ojos, nariz y garganta.

Dosis Usual

En solución al 0.05 %

Envase y Almacenamiento

Consérvese en frascos bien cerrados.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método microbiológico de 2 + 2 dosis de difusión en placa usando la técnica de perforación de agar, y se adaptó el método para la valoración de la actividad de Gramicidina en materia prima y en un ungüento polifármaco.

La evaluación estadística de los resultados obtenidos al aplicar el método desarrollado indica que es preciso, exacto y confiable, por lo que se recomienda su aplicación.

Para darle sensibilidad al método se buscaron las condiciones óptimas de pH, concentración del microorganismo, volumen del medio de cultivo, el solvente más adecuado para favorecer la difusión del antibiótico en el agar, y la selectividad se obtuvo al hacer la separación de los excipientes y activos que pudieran interferir en la valoración.

La elección del disolvente (D M S O - AGUA) para la Gramicidina favoreció la difusión de ésta a través del agar por la técnica de perforación elegida, facilitando la penetración del antibiótico evitando el desarrollo del microorganismo. Las concentraciones de 5 y 25 mcg. de Gramicidina por ml, elegidas para la dosis alta y baja respectivamente presentaron valores de los halos de inhibición de diferentes medidas, manteniendo en todos los datos diferencias considerables y constantes, siendo más sencillos y prácticos que el turbidimétrico recomendado en los libros oficiales.

Se recomienda su inclusión en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, para la determinación de la actividad antibiótica de la materia prima de Gramicidina ya que el método propuesto presentó reproducibilidad y exactitud en los resultados obtenidos en todos los casos en que se analizó el antibiótico.

Se desarrolló el mismo método en un ungüento de Gramicidina, extrayendo los extractos y aplicándolos a cajas preparadas como se describe en el método, no obteniéndose respuestas por parte del microorganismo. Podemos concluir que la extracción propuesta es efectiva para la separación de cualquier sustancia que pudiera interferir.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Arkin, H., and Colton, R.R., Tablets for Statisticians.
Edition, Barnes & Noble, Inc., New York, 1971.
- 2.- British Pharmacopoeia., Pharmaceutical Press, London 1973.
- 3.- Burger, A., Medicinal Chemistry. 2a. Edition, Interscience Publisher,
Inc. New York 1960.
- 4.- Code of Federal Regulations., Title 21 parts 141-599 (436), Washington
1974.
- 5.- Evans, R.M., The Chemistry of de Antibiotics used in Medicine. Pergamon
Press, New York, London 1965.
- 6.- Garrod, L., and O'Grady F., Antibiotic and Chemotherapy 4a. Edition, Chur
chill Livingstone, Edinburgh and London 1973.
- 7.- Grant, L. Eugene., Control de Calidad Estadístico. Ed. Continental, S.A.
México, D.F., 1966.
- 8.- Grove & Randall W.A., Assay Methods of Antibiotic's Laboratory Manual.
Medical Encyclopedia, New York.
- 9.- Higuchi, T., and E. Brochmann., Pharmaceutical Analysis Interscience Publi-
shers, New York, London 1961.
- 10.- Hidalgo y Mondragón Ma. del C., Farmacia Química. 1a. Ed. Alhambra, S.A.
1969.
- 11.- Hobby, L.G., Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for
Microbiology, Bethesda Maryland 1968.

- 12.- Horwitz, W., Chichilo, P., and Reynolds, H., Official Methods of Analysis The Association of Official Analytical Chemists, 7th. Ed. Washington 1970.
- 13.- Kavanagh F., Analytical Microbiology. Academic Press, New York and London. 1972.
- 14.- Lorian, M., V. D., Antibiotics and Chemotherapeutic agents in Clinical and Laboratory Practice., Charles C. Thomas, Illinois, U.S.A. 1966.
- 15.- Litter M., Farmacología, 4a. Ed. El Ateneo 1970.
- 16.- Martindale, Extra Pharmacopoeia 26 th. Edition, The Pharmaceutical Press, London 1972.
- 17.- Martin & Cook., Remington's Practice of Pharmacy. 11a. Edition, The Merck Publishing Cía. 1965.
- 18.- Morrison, R.T., and Boyd, R.N., Organic Chemistry 2a. Edition, Allyn and Bacon Inc. Boston 1971.
- 19.- National Formulary XIII., American Pharmaceutical Association. Washington.
- 20.- Osol-Farrar., The Dispensatory of The United States of American. 25 th. Edition, J.B. Lippincot Company 1955.
- 21.- Osol-Pratt-Atschule., The United States Dispensatory and Physician's Pharmacology. 26 th. Edition. J.B. Lippicott Company, Philadelphia. Toronto 1967.
- 22.- The United States Pharmacopoeia, XIX revision., U.S.P. Convention, Inc. Washington D.C. 1975.
- 23.- The Merck Index., 7th. Edition, Merck & Co. Inc. 1960.

REVISTAS

- a).- Chemical Abstracts., Vol. 70, p. 426 (1969)
- b).- Horn, M.J., and D.B. Jones., J. Biol Chem. 157, 153 (1945)
- c).- Hotchkiss, R.D., and Dubos R.J., Biol Chem. 141, 155-171 (1941)
- d).- Ivashkiv, E., Biotechnology and Bioengineering. 15 (4), 821-5 (1973)
- e).- Gause, G.F., and M.G. Brazmikova, Nature, London 154, 703 (1944)
- f).- Warner, B.T., J. Pharm. Pharmacol. 16, 220-233 (1964).