

2ej
A



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

SULFATO ACIDO DE KANAMICINA

T E S I S

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

Rosa Eugenia Albareda Soberón

México, D. F.

1986



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA



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 está 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.

INDICE

CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
CAPITULO II	
GENERALIDADES	4
CAPITULO III	
METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DEL SULFATO ACIDO DE KANAMICINA	18
CAPITULO IV	
PARTE EXPERIMENTAL	37
CAPITULO V	
CONCLUSIONES	44
CAPITULO VI	
PROPOSICION COMO MONOGRAFIA A LA FARMACOPEA NACIONAL DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS	45
CAPITULO VII	
BIBLIOGRAFIA	62

CAPITULO I
INTRODUCCION.

Objetivo.-

El presente trabajo tiene como objetivo hacer un estudio de las propiedades físicas, químicas, farmacológicas, y las ventajas del uso del sulfato ácido de kanamicina como medicamento; asimismo proponer este estudio como monografía para la F.N.E.U.M.

Introducción.-

Entre los centenares de compuestos producidos por microorganismos, sólo existe un número relativamente pequeño que posee un índice terapéutico favorable, estos son los llamados antibióticos.

Desde el punto de vista químico los antibióticos se han dividido en:

A) Aminoglucósidos.

En este grupo están incluidos: las Estreptomicinas, Neomicina, Kanamicinas, Gentamicinas, Paromicina y derivados de éstos antibióticos.

B) Antibióticos Polienos (antifúngicos).

En este grupo de antibióticos están incluidos la-Griseofulvina, la Nistatina, la Anfotericina B, la Primaricina.

Todos estos antibióticos tienen propiedades químicas similares y contienen un grupo cromóforo polieno conjugado común característico en el espectro de absorción U.V.

C) Antibióticos carbóticos.

Su nombre se debe a que contienen una característica común: la lactona macrolítica en su estructura y pueden ser

divididos en dos subgrupos:

Antibióticos Macrólidos Polienos, en éste último -- están incluidos la Espiramicina, la Leucomicina, la Eritromicina, la Oleandomicina Fosfato.

D) Penicilinas.

La obtención biosintética de penicilinas se logra -- a partir de géneros *Penicillium Crysogenum*. Actualmente se -- obtienen también sintéticamente por la acilación del ácido -- 6-amino penicilánico (6-APA), el cual se obtiene en gran esca -- la por la hidrólisis química de la benzil penicilina y de la fenoximetilpenicilina.

En este grupo de antibióticos están incluidos:

La Benzilpenicilina, la Fenoximetilpenicilina potásica, la Benzilpenicilina Procaína, la Benzilpenicilina Benzotínica, Cloxacilina, Cicloxacilina, Amoxicilina, Ampicilina, Metampicilina, Epicilina, Carbencilina, Metacilina, Iodohidrato del éster dietil aminoetilico del ácido bencilpenicilínico, Cefalotina sódica, Cefaloridina.

E) Antibióticos Polipéptidos.

En este grupo de productos naturales, la clasificación se basa en la derivación biogenética como la sugieren -- Abraham y Newton. Estos autores definen 3 grupos principales, dependiendo si los antibióticos se derivan de a) aminoácidos, b) acetatos o propionatos, c) azúcares derivados de aminoácidos.

a) Cloranfenicol, penicilinas y cefalosporinas.

De varios polipéptidos, tirocidinas, gramicidinas, -- polimixinas, bacitracinas, actinomicinas, viomicinas tios --

treptomycinas, circulinas, gramicidina, bacitracina A, bacitracina Zn, estreptomycin sulfato, tirotricina, polimixina B sulfato.

F) Antibióticos Tetraciclinas.

El primer antibiótico descubierto fué la 7-clortetraciclina (aureomicina).

Las tetraciclinas son substancias cristalinas, amarillas anfotéricas y tienen baja solubilidad en agua.

Los ácidos y bases fuertes atacan a las tetraciclinas que tienen un grupo hidroxilo con el C_6 causando pérdida en la actividad modificando el anillo.

Las tetraciclinas son bactericidas y bacteriostáticas, por esto pertenecen al grupo de antibióticos que actúan por inhibición de la síntesis protéica. En este grupo de antibióticos están incluidos: la Clortetraciclina, la Tetraciclina, la Dimetil Clortetraciclina, la Oxitetraciclina, Fosfato complejo de Tetraciclina, la Minociclina Clortetraciclina, Pirrolidin - Metil Tetraciclina, Guayacol Sulfonato de N-Metil Tetraciclina, Cloranfenicol, Novobiocina, Rifamicina S.V., Rifampicina.

CAPITULO II

GENERALIDADES .

2.1 HISTORIA.

Todo producto elaborado por un organismo y que es ca¹ paz de atacar y destruir a ciertas bacterias causantes de enfermedades. Puede decirse que la actual quimioterapia biológica -- por agentes producidos por microorganismos tiene su verdadero origen en los trabajos de Pasteur y Joubert (1877); que versan sobre las asociaciones bacterianas; pero es Alexander Fleming - quien desarrolla tan trascendental investigación en su trabajo. La acción antibacteriana de los cultivos de un *Penicillium*, con especial referencia a su uso en el aislamiento del B. influenzae (1929) trabajo en el que se menciona y describe una sustancia antibacteriana, la penicilina, que presenta una actividad -- muy marcada.

A partir de el trabajo de Fleming, el número de publicaciones acerca de los agentes antibióticos producidos por microorganismos es muy grande.

La kanamicina es un antibiótico básico descubierto por el Dr. Hamao Umezawa, en el Instituto Nacional de Health de Japón, en 1955.

2.2 OBTENCION.

La kanamicina es obtenida a través de la fermentación del *Streptomyces kanamyceticus*, aislado en Negano Prefecture - en Japón.

El producto de fermentación es purificado para dar lugar al sulfato de kanamicina, y que después al agregársele ácido sulfúrico se obtiene el sulfato ácido de kanamicina.

2.3 CARACTERISTICAS

La kanamicina tiene una fuerte acción bactericida - sobre bacterias gram-negativas, y sobre Mycobacterium tuberculosis es mayor.

Sobre Staphylococci, Escherichia coli, Shigellas y Mycobacterium tuberculosis los cuales tienen resistencia comprobada sobre otros antibióticos y que sin embargo son sensibles a la kanamicina (sulfato o sulfato ácido).

La kanamicina es rápidamente absorbida y recibida - en altas concentraciones en sangre y en órganos, es rápidamente excretada y eliminada por riñón, todavía en forma activa.- La kanamicina es muy estable, aún en solución acuosa.

PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS.

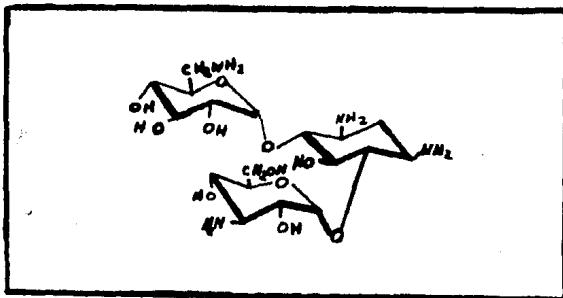
La estructura de la kanamicina es ilustrada (ver fig 1), y forma sales solubles en agua con ácido sulfúrico, etc.- El sulfato de kanamicina cristalina tiene como fórmula molecular: $C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$.

El sulfato ácido de kanamicina, la cual es obtenida agregando ácido sulfúrico al monosulfato de kanamicina, es un cristal blanco amorfo, y más soluble en agua que la kanamicina monosulfato. La kanamicina sulfato ácido en solución tie --

ne un pH de 5.0-7.0 a una concentración de 50 mg(potencia)/ml.

La kanamicina sulfato ácido y la kanamicina sulfato-son muy estables, aún en solución a temperatura ambiente y por un tiempo de dos meses.

No pierden actividad (no se degradan) cuando se calienta a 100°C por una hora.



(fig 1)

4-(6-amino-6-deoxy-alfa-D-glucopyranosyl)-6-(3/deoxy-alfa-D-glucopyranosyl)-1,3-diamino-1,2,3-trideoxy-myo-inositol.

CARACTERISTICAS MICROBIOLOGICAS.

La kanamicina tiene una fuerte actividad inhibitoria tanto para bacterias gram-positivas como para gram-negativas, y para la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* en especial. La acción de la kanamicina es bactericida. Algunos microorganismos patógenos son resistentes a la penicilina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol, oleandomicina y novobiocina, pero que sí son sensibles a la kanamicina. La *Mycobacterium tuberculosis* está incluida entre los que son resistentes a la estreptomina que es fuertemente inhibida por la kanamicina y no hay resistencia cruzada entre la kanamicina y estas sustancias.

Solo con *Staphylococo* y *Escherichia coli*, aparece una incompatibilidad entre la kanamicina y la estreptomina, y las bacterias resistentes a la kanamicina también son resistentes a la estreptomina. La kanamicina y la neomicina muestran completa resistencia cruzada con los mismos patógenos.

La sensibilidad del *Proteus vulgaris* a la kanamicina es variable, pero muchas variedades de ellos son sensibles al antibiótico y pocas variedades de estafilococos son menos sensibles a la kanamicina.

ESPECTRO ANTIMICROBIANO DE LA KANAMICINA.

(concentraciones mínimas inhibitorias)

Organismo	mcg (potencia)/ml.
<i>Micrococcus pyogenes</i> . var. aureus 209P	0.6 ~ 1.25
<i>Sarcina lutea</i>	20 ~ 40
<i>Diplococcus pneumoniae</i>	0.75
<i>Streptococcus hemolyticus</i> (A,Gr-13)	50
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.75
<i>Bacillus subtilis</i> PCI-219	0.6 ~ 1.25
<i>Bacillus anthracis</i>	1.25 ~ 2.5
<i>Salmonella thyphosa</i>	2.5 ~ 5
<i>Salmonella paratyphi</i> A	2.5
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	2.5
<i>Shigella dysenteriae</i>	5
<i>Shigella flexneri</i>	5
<i>Shigella sonneri</i>	5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.25
<i>Neisseria</i> sp	2.5
<i>Escherichia coli</i>	5
<i>Brucella melitensis</i>	1.25
<i>Proteus vulgaris</i> (OX 19)	10
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	18.9 ~ 50
<i>Mycobacterium</i> 607	2.5
<i>Mycobacterium phlei</i>	2.5

<i>Streptomyces griseus</i>	1.0
<i>Aspergillus niger</i>	más de 1000
<i>Candida albicans</i>	más de 1000

El mecanismo de acción de la kanamicina no es conocido, sin embargo los efectos sobre gran cantidad de microorganismos has sido demostrados. La mejor inhibición del proceso celular de la síntesis es el paro de producción de protefnas en las bacterias.

El sitio de acción es en ribosoma y el mecanismo es seguido por una conversión de la síntesis protéica a una aberración compleja que no va a ser usada en futuras síntesis de protefnas. Más tarde, la cual podría ser tóxica, por lo que los efectos bactericidas son muy rápidos.

Diferentes especies de microorganismos mueren a distintos tiempos, la *Klebsiella pneumoniae* es la que muere más rápido. La *Pseudomona aeruginosa* la más lente. En estudios monográficos se ha encontrado que el efecto es de alteración severa en la forma estructural e integral de la bacteria. Especificamente en la lectura de los enlaces del ácido ribonucleico en donde se ha encontrado, pero en general la inhibición de la síntesis protéica es probablemente el mecanismo de acción más importante.

Especificamente de los efectos en la susceptibilidad celular es más parecida a requerimientos para poder recidir en el ribosoma.

El efecto bacteriano de la kanamicina no influenciado por la sangre, y es atenuado sólo por diferentes concentraciones de las sales; inclusive la leche humana y albúmina son inactivas.

"La kanamicina es un antibiótico bactericida y bacteriostático".

2.4 FARMACOLOGIA.

Pruebas de laboratorio efectuadas sobre conejo al que se administraron 50 mg de kanamicina/Kg de peso, demostraron después de una hora una concentración de 75 mcg/ml a nivel sanguíneo; después de tres horas de administrado la concentración fué de 10 mg/ml; al cabo de cinco horas la concentración fué de 2 mcg/ml.

A otro conejo se le administró una dosis a razón de 25 mg/Kg de peso, de kanamicina, una hora después, a nivel sanguíneo se encontró una cantidad de 24 mcg/ml; habiendo transcurrido tres horas se encontró una cantidad de 2.6 mcg/ml. Se puso de manifiesto que los niveles séricos se alcanzan en un período de 30 a 60 minutos después de haber sido administrados, y rápidamente decrece.

Por vía oral se administra kanamicina, a pollos, gatos, y conejos, en pequeñas cantidades, las cuales fueron defecadas al 94% de la dosis administrada.

DISTRIBUCION.

Como una consecuencia de los experimentos efectuados, la kanamicina se encuentra distribuída en mayor proporción en los órganos de los conejos utilizados en los experimentos; pulmón y riñón, y en menores cantidades en bazo, hígado, ovarios; y en ínfimas cantidades en bilis.

En otro experimento que consiste en administrar kanamicina por aerosol a ratas, se encontró que 26 horas más tarde existían 6.58 mcg/g en pared pulmonar y 3.52 mcg/g en pared renal.

Por las pruebas realizadas se confirma que la kanamicina es bien absorbida y se distribuye en las paredes de los órganos mencionados; no se encontró kanamicina en sangre cuando es administrada por el sistema de aerosol.

Habiendo administrado el antibiótico por el mismo sistema de aerosol, tampoco se encontraron vestigios en cerebro o en músculo.

Se llevó a cabo un experimento en perros a los que se administró kanamicina, por vía oral a razón de 50 mg/Kg de peso; después de tres horas se comprobó que la concentración era de 15 mcg/ml en fluido espinal y en cerebro.

Se observó que a través de los experimentos realizados en las ratas, in vivo, que la kanamicina se absorbe en el núcleo y mitocondria en células de hepatocitos de los mismos animales.

EXCRECION.

Cuando se administra la kanamicina a un hombre por vía intramuscular se aprecia que es excretada por riñón, y se observa que la concentración en orina se presenta después de una administración adecuada.

2.5 TOXICIDAD.

La LD₅₀ en ratón:

Por vía intravenosa es de 316 mg/Kg \pm 24.4 mg/Kg.

Por vía subcutánea es de 1648 \pm 54.4 mg/Kg de peso.

Por vía intraperitoneal es de 1679 \pm 186 mg/Kg.

Por vía oral es de más de 10,000 mg/Kg de peso.

La LD₅₀ en rata:

Por vía intravenosa es de 300 a 600 mg/Kg de peso.

La LD₅₀ en perro:

Por vía intravenosa es de 150 a 300 mg/Kg de peso.

TOXICIDAD CRONICA.

Se ha demostrado en pruebas de laboratorio que la toxicidad crónica se manifiesta:

En ratón.- a dosis subcutáneas de 100, 200, 400 - mg/Kg de peso por 30 días no causan daño o variaciones de peso.

Con dosis de 299 mg/Kg de peso administrada por vía intraperitoneal a razón de 44 veces, no causan mortalidad; sin embargo doblando la dosis a 400 mg/Kg de peso se produce la muerte en el 20% de los animales después de la novena administración.

En rata.- a dosis subcutáneas de 100 y 200 mg/Kg de peso por día, se observa que no causa variación de peso después de 5 meses y medio de haber sido administrada.

Si es administrada en dosis orales de 200 a 400 mg/Kg de peso por día durante dos semanas, no se observa reacción-- alguna: si la dosis diaria se incrementa de 500 a 1000 mg/Kg de peso, después de ser administrada continuamente por 6 semanas, no hay evidencia de que cause toxicidad crónica; pero si se incrementan las dosis a 166 mg/Kg de peso por día, se observa que se produce albumuria y cilindruria. Una dosis diaria de 300 mg/Kg de peso administrada por 42 días seguidos, no -- causa deterioro alguno.

En gato.- a dosis subcutáneas de 300 mg/Kg de peso administrada durante un período de 21 días causa solamente una leve irritación, no causa ataxia; a dosis de 200 a 400 -- mg/Kg de peso, causa una rápida baja de peso, además de signos de una fuerte nefritis que ha sido comprobada en la necropsia.

Una dosis de 100 mg/Kg de peso, no causa síntomas de toxicidad después de la trigésima administración por vía -- subcutánea : si se continúa la administración, antes de 175 -- inyecciones se observa un daño en el oído.

En perro.- a dosis diarias de 100 mg/Kg de peso, - administrada durante 60 días, no causa daño renal alguno; las proteínas séricas y eritrocitos quedan normales.

En el hombre.- después de una administración intramuscular a pacientes anestesiados se encontró un bloqueo neuromuscular con depresión respiratoria.

Además si la kanamicina se administra en forma continua a personas normales o con padecimientos de diferentes tipos, se observa que el paso del antibiótico corresponde a un 60% de la creatinina renal.

La kanamicina administrada a seres humanos en dosis de 200 mg por Kg de peso causan nefritis con albumuria y hematuria antes de 2 ó tres semanas.

Por vía oral a dosis mayores de 1000 mg/Kg de peso, por día y durante 6 semanas, se ha observado que no es tóxica. Los efectos tóxicos a corto plazo en el ser humano son náuseas, vómito y diarrea cuando la kanamicina es administrada por vía oral; sin embargo tiene menor riesgo de una mala absorción -- que la neomicina.

La administración intramuscular puede ser dolorosa pero produce menos efectos secundarios que por otras vías como la subcutánea. Las reacciones secundarias que se presentan son: comezón, fiebre, dolor de cabeza, y algunas veces parastesia; también puede producir un leve daño renal. El daño más severo que puede producir es la afectación del octavo nervio craneal con la consecuencia de la disminución del sentido auditivo, llegando a veces a la pérdida total del oído, especialmente si el tratamiento es prolongado, como en el caso de la

tuberculosis o si se tiene algún padecimiento en el oído, la reacción neurotóxica puede disminuir gradualmente, si la dosis total que no exceda de 15 g durante el período de 15 días. Las reacciones neurotóxicas ocurren con menor incidencia en pacientes con menos de 40 años de edad, con funciones renales normales.

TRATAMIENTO CONTRA LOS EFECTOS TOXICOS

Contra el bloqueo neuromuscular se han empleado -- con éxito el gluconato de calcio administrado por vía intravenosa o bien la neostigmina.

Para evitar la ototoxicidad en pacientes con daño -- renal, lo más indicado sería la diálisis.

2.6 USOS.

Para el tratamiento de infecciones provocadas por -- microorganismos gram-negativos susceptibles a la kanamicina, -- especialmente el *Proteus vulgaris*, puede utilizarse en períodos cortos; por otra parte la kanamicina ha sido empleada para tratar infecciones provocadas por *Staphylococcus* cuando -- otras sustancias no han tenido éxito.

Cuando el sulfato de kanamicina se administra por -- vía intramuscular, debe ser estrictamente vigilada por los -- daños que puede causar en adultos que requieren un equivalente a 15 mg/Kg de peso, y no más de 1.5 g diarios como límite, y en el curso del tratamiento de 15 g.

Si en el transcurso de los siguientes 3 ó 4 días de iniciado el tratamiento no hay una reacción favorable, dicho tratamiento deberá ser substituído.

Los niños pueden recibir una dosis total diaria hasta un máximo de 600 mg y por no más de 6 días.

En infecciones fuertes la kanamicina se puede administrar por vía intravenosa en una solución al 25% de kanamicina, a razón de 3 a 4 ml por minuto, hasta llegar a un total de 15 ó 30 mg/Kg de peso; la kanamicina ha sido administrada en forma similar a la neomicina como antiséptico intestinal en dosis diarias de 12 g durante un mes; para niños la dosis ha sido de 50 mg/Kg de peso diariamente, durante períodos de 5 a 7 días.

Cuando la kanamicina se ha administrado durante un mes, se ha notado que los microorganismos se hacen resistentes y decrece su actividad.

Para el tratamiento por infecciones en las vías respiratorias se recomienda la administración por aerosol, en solución salina con una concentración de 250 mg/ml de kanamicina.

2.7 INCOMPATIBILIDADES

Se han descubierto incompatibilidades después de haber sido administrado por vía intramuscular el sulfato de kanamicina, disuelta en agua estéril, y un ml de cualquiera de las siguientes sustancias en solución:

heparina, succinato de sodio, hidrocortizona, fenobarbital -

sódico, dietanolamina sulfafurazol, y edisilato de procloprazina, nitrofurantofna sódica, aminofilina, succinato sódico - de hidrocortizona o de metil prednisolona en infusión intravenosa, gluconato de calcio, clorpromazina, sulametato sódico de colistina, novobiocina, fenobarbital, polimixina B, promazina, proteínas hidrolizadas inyectables, quinalbarbitato de sodio, bicarbonato de sodio, thiopentonato de sodio y complejo B vitamínico.

Es rápidamente inactivada por la meticilina sódica.

La solución se vuelve turbia o se precipita antes - de una hora cuando se mezcla la kanamicina con Cefalotina sódica o heparina con anfotericina conteniendo 200 mg/l de kanamicina en solución a una concentración de 4 g/l inmediatamente aparece una precipitación cuando se mezcla la kanamicina y una solución de 20,000 unidades /l de heparina, o metohexitona sódica en solución a la concentración de 4 g/l en dextrosa inyectable o cloruro de sodio inyectable. Al mezclar la kanamicina con flucoxacilina y ampicilina, también se precipita, y se produce una pequeña disminución en la potencia de la kanamicina así mismo con cloxacilina o meticilina, y con carbenicilina.

CAPITULO III

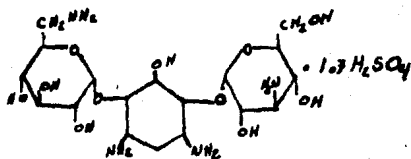
METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DEL SULFATO ACIDO DE KANAMICINA.

Introducción.-

Debido a que no existen actualmente métodos específicos para la determinación del sulfato ácido de kanamicina, nos hemos basado en los métodos existentes para el sulfato de kanamicina. Por ser similares tienen las mismas características antibióticas pero difiere principalmente en su forma, solubilidad y potencia. El sulfato ácido de kanamicina es muy soluble en agua y con una potencia cercana a 680 mcg/mg. El sulfato de kanamicina es polvo, soluble en agua (menos soluble que el sulfato ácido) y con una potencia microbiológica de no menos de 750 mcg/mg. Así pues basándonos en los métodos existentes para la determinación de el sulfato de kanamicina en forma experimental.

METODOS ANALITICOS PARA SULFATO ACIDO DE
KANAMICINA.

Contiene el equivalente a no menos del 68 por ciento de kanamicina ($C_{18}H_{36}N_4O_{11}$), con una actividad antibiótica correspondiente a 680 mcg/mg, y no más del 1.78% de sulfato de kanamicina B, calculado sobre la base anhidra.



Descripción:

Polvo cristalino, blanco, inodoro.

Solubilidad:

Muy soluble en agua, insoluble en alcohol, acetona, acetato de etilo y benceno.

Ensayos de Identidad:

Responde a la prueba de identidad para sulfato ácido de kanamicina.

Se disuelven 10 mg de la muestra en 1 ml de agua, se agrega 1 ml de una solución 1:500 de hidrato de tricetohidriⁿdeno en alcohol butílico normal y 0.5 ml de piridina. En baño de vapor se calienta durante cinco minutos y se agregan 10 ml de agua, se produce coloración púrpura oscura.

Residuos a la Ignición: no más de 0.5%.

En un crisol de porcelana puesto previamente a peso constante, se depositan aproximadamente 1 g de muestra. Se incinera a baja temperatura hasta carbonización completa, durante la cual se puede cubrir parcialmente con una tapa de porcelana, se deja enfriar y enseguida se agregan 2 ml de ácido nítrico y cinco gotas de ácido sulfúrico. Se calienta con pre - caución hasta que se produzcan humos blancos. Inmediatamente se incinera entre 500-600°C en una mufla, hasta incineración - total. El crisol se enfría en un desecador y se pesa.

AGUA: No más de 4.5%.

Pesar 100 mg de muestra de sulfato ácido de kanami - cina, finamente pulverizado en un pesafiltros previamente a - peso constante. Colocar en una estufa al vacío a una presión de 5 mm de Hg. a temperatura de 60°C durante tres horas, ta - par el pesafiltros y enfriar en un desecador con sílica gel, y pesar.

pH: entre 5.0-7.0

La determinación del pH se establece para substan - cias en las cuales la actividad del hidrógeno redunda en su - estabilidad química y física, o bien en su actividad farmaco - lógica. El pH se mide generalmente, con un potenciómetro pro - visto de dos electrodos; uno de vidrio que es sensible a la - actividad del ión hidrógeno y el otro de Calomel, que es el - de referencia, normalmente la determinación se verifica a 25° ± 2°C.

Antes de verificar la medición del pH de una solución, el aparato se ajusta determinando el pH de dos soluciones amortiguadoras tipo, cada una con un pH cercano al que se supone tiene la muestra por valorar, de tal modo que este puede quedar en la medida de las dos soluciones una diferencia entre sí con un máximo de 2 unidades de pH.

Si el producto observado difiere en más de 0.05 unidades de pH el valor conocido, se hacen los ajustes necesarios; hay que verificar por lo menos dos mediciones de una misma solución, si se obtienen resultados diferentes es necesario repetir las hasta obtener una medición correcta. Después de cada prueba los electrodos deben mantenerse sumergidos en agua.

Factores como: temperatura, sólidos en suspensión, influyen en la medición del pH de una sustancia.

El agua se emplea como disolvente, y debe ser destilada para cualquier determinación del pH, y debe estar libre de bióxido de carbono.

Las soluciones se conservan en recipientes herméticamente cerrados, se emplean dentro de los tres meses siguientes a su preparación y se desechan inmediatamente que se observe enturbiamientos, precipitado o alguna otra anomalía.

De una solución al 10%, de sulfato ácido de kanamicina en agua destilada libre de bióxido de carbono es medida directamente con el potenciómetro.

Color de la solución: No debe de ser más de 0.300.

Se disuelven 2.8 g de la muestra en 8 ml. de agua de
tilada, se filtra por papel Whatman # 5, determinar la absor-
bancia a 400 mm.

Valoración: potencia microbiológica de 680 mcg/mg.

Material y equipo de laboratorio:

Cilindros: se usan cilindros de acero inoxidable -
con un diámetro exterior de 8 mm, diámetro interior de 6 mm y
longitud de 10 mm \pm 0.1 mm., en todas las medidas.

Placas: se usan cajas Petri de plástico o de vidrio
de 20 x 100 mm. Las cubiertas de las cajas pueden ser de por-
celana vidriada, pero únicamente en su parte exterior.

Deben ser lavadas con suficiente frecuencia para man
tenerlas limpias y estériles al horno y se utilizan frías.

Solución amortiguadora diluyente de fosfatos:

Fosfato de potasio 0.1M., pH 8.0 (después de este-
rilizada). Se disuelven 16.73 g de fosfato de potasio dibási-
co y 0.523 g de fosfato de potasio monobásico en agua hasta -
1000 ml. La solución se ajusta con hidróxido de potasio 10 N
o con ácido fosfórico 18 N, según sea necesario, para que des
pués de la esterilización el pH sea de 7.9-8.1.

MEDIOS DE CULTIVO.

Peptona	6.0g
Extracto de levadura	3.0g
Extracto de carni	1.5g
Digerido pancreático de caseína .	4.0g
Glucosa	1.0g

Agar 15.0 g
Agua destilada cbp 1,000 ml

pH después de la esterilización a 121°C durante 30 minutos:
7.9-8.1.

Germen de prueba.

Staphylococcus Aureus.

Método de preparación.

Preparación de la suspensión: el organismo de prueba se mantiene en agar inclinado, al que se le agregan 10ml del medio ya mencionado y se incuba entre 32°-35°C durante 24 horas, el desarrollo se lava con 3 ml de S.R. salina estéril y se pasa a una botella de Roux que contenga 250 ml del medio. La suspensión del organismo se extiende sobre toda la superficie del agar con la ayuda de cuentas de vidrio estériles e inclinaciones a ambos extremos, se incuba entre 32°-35°C y el desarrollo resultante se lava con 50 ml de solución isotónica estéril.

Ajuste de la suspensión: se utiliza un fotocolorímetro adecuado y un tubo de 13 mm de diámetro interno como celdilla de absorción. Una alícuota de la suspensión se ajusta diluyéndola hasta obtener un 25% de transmisión de luz, a una longitud de onda de 580 milimicras y con este dato, se ajusta el volumen total de la suspensión. Se determina el volumen de la suspensión ajustada se agregará a cada 100 ml de agar o del medio de cultivo adecuado, por medio de pruebas en placas o en tubos.

La suspensión del germen de prueba se conserva en - refrigeración durante una semana.

Preparación de las placas.

Se usa el mismo medio tanto para la capa base como para la capa sembrada. Con 21 ml para la capa base y 4 ml para la capa siembra por cada una de las placas.

A la capa sembrada se agregan 0.4 ml del inóculo de *Staphylococcus aureus* en solución isotónica al 25% de transmisión por 100 ml de medio incubándose entre 32° y 35°C.

Preparación de las soluciones concentradas y diluidas tipo.

Se pesa una porción con exactitud del antibiótico - patrón de referencia, se disuelve preparando la solución concentrada tipo a 1 ml. (Debe conservarse en refrigeración no más de 30 días).

Para la preparación de las soluciones diluidas tipo de concentraciones diferentes, que son para T_1 de 3.2 mcg/ml., para la T_2 de 4.0 mcg/ml, para la T_3 de 5.0 mcg/ml, para la T_4 de 6.25 mcg/ml, y para la T_5 de 7.81 mcg/ml, son alícuotas que se llevan a 100 ml con la solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.8.

La solución diluida tipo óptima para la comparación dentro de la valoración, es aquella cuya concentración corresponde a la dilución media entre las soluciones diluidas tipo T_3 .

Preparación de la solución concentrada diluida de-

sulfato ácido de kanamicina, por valorar. El disolvente usado para disolver la muestra es el mismo que para la solución tipo, la solución diluida se prepara con una alícuota de la solución concentrada para llegar a una concentración final de 5 mcg/ml (similar a la T_3).

Valoración.

Se preparan las placas inoculadas como sigue: la capa base se prepara agregando el volúmen de agar (21 ml) indicado anteriormente para cada caja petri.

Se distribuye uniformemente y se deja solidificar de manera que se forme una superficie plana y lisa. La capa sembrada se prepara agregando el inóculo ajustado el germen de prueba a la cantidad suficiente de agar que ha sido fundido y enfriado entre 48°-50°C y agitando el matraz que lo contiene con movimiento rotatorio para obtener una suspensión homogénea sin inocular. A cada una de las placas con la capa base sin inocular se agregan 4 ml del agar sembrado, extendiéndolo uniformemente sobre toda la superficie. Cuando la superficie de agar sembrado (inoculado) se ha solidificado, se colocan en cada una de las placas 6 cilindros, de manera que queden separados entre sí, en forma radial, a intervalos de 60°, a una distancia del eje de 2.8 cm.

En la elaboración de la curva tipo, se usa un total de 12 placas, 3 para cada solución diluida tipo excepto para la solución diluida tipo óptima (cuya concentración corresponde a la dilución media T_3 , con la cual se llenan 3 cilindros con una de las otras soluciones diluidas tipo. De esta mane-

ra en las 12 placas habrá 36 zonas de inhibición para cada una de las otras 4 soluciones tipo (T_1, T_2, T_4, T_5).

Para cada muestra problema por valorar se usan tres placas. En cada una de las cajas se colocan 6 cilindros, los cuales se llenan, alternando así con la solución de la muestra problema, cuya concentración estimada corresponda a la solución diluída tipo óptima. De esta manera habrá 9 zonas de inhibición, tanto para la solución diluída óptima, como para la solución de la muestra que se está valorando.

Después de que todas las placas han sido incubadas a la temperatura apropiada entre 16 a 24 horas, se miden los diámetros de la zona de inhibición, por medio de una regla con divisiones en milímetros, con un calibrador o un proyector óptico.

Estimación de la potencia.

Para preparar la curva tipo se promedian en cada una de las 4 series formadas por 3 placas, los 9 diámetros de las zonas de inhibición correspondientes a la solución diluída tipo óptima T_3 y los 9 diámetros de las zonas de inhibición de cada una de las soluciones tipo (T_1, T_2, T_4, T_5); también se promedian los 36 diámetros de las zonas de inhibición de las soluciones diluídas tipo óptima T_3 , correspondientes a las 4 series y el promedio obtenido es la base para la corrección. Si cada uno de los 4 promedios de T_3 de cada serie, son iguales al promedio base de corrección, no es necesario hacer correcciones en los promedios individuales.

Sirve como ejemplo la corrección que corresponde a la zona de inhibición de la solución diluída tipo, de mayor -

concentración T_5 . Si el promedio base de corrección es de -- 18.0 mm (promedio de los 36 diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluída tipo, de la T_3) y el promedio de los 9 diámetros de las zonas de inhibición de la misma solución T_3 , de la serie respectiva de 3 placas, es de 17.8 mm, - la corrección es de 0.2 mm. Si el promedio de los diámetros de la misma serie, correspondiente a la solución diluída tipo T_5 es de 17 mm, el valor correcto es de 17.2 mm. Con los diámetros corregidos de las zonas de inhibición de las soluciones diluídas tipo (T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , y T_5) incluyendo el promedio de los 36 diámetros correspondientes a las zonas de inhibición de la solución diluída tipo, óptima (T_3) y las concentraciones del antibiótico respectivo, en mcg/ml, se traza la curva tipo en papel semilogarítmico de dos ciclos, anotando en las abscisas los diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluída tipo óptima T_3 y las concentraciones del antibiótico, en mcg/ml, se traza la curva tipo en papel semilogarítmico de dos ciclos, anotando en las abscisas los diámetros de las zonas de inhibición y en las ordenadas, las concentraciones del antibiótico.

La curva tipo se traza a través de estos puntos o - bien se unen los puntos correspondientes a las zonas de inhibición de diámetro más alto y más bajo obtenidas por medio de las siguientes ecuaciones:

$$A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

donde:

B es el diámetro calculado, en milímetros para la zona de inhibición de la solución tipo diluida de más baja -- concentración T_1 . A es el diámetro calculado, en milímetros, para la zona de inhibición de la solución tipo diluida de más alta concentración T_5 . c es el diámetro promedio, en milímetros, de las zonas de inhibición de las 36 lecturas de la solución tipo diluida óptima T_3 , en las 4 series. a, b, d, e -- son los diámetros promedio corregidos, en milímetros, de las zonas de inhibición de las otras cuatro soluciones tipo diluidas, T_1 , T_2 , T_4 , y T_5 .

Para determinar la potencia de la muestra se promedian los diámetros de las nueve zonas de inhibición de las 3 placas usadas, tanto en la solución diluida tipo T_3 , como en la solución de la muestra problema. Si el diámetro de las zonas de inhibición de la muestra, es mayor que el diámetro promedio de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo respectiva, la diferencia se suma al diámetro de la zona de inhibición de la solución diluida tipo T_3 . Si el diámetro promedio de las zonas de inhibición de la muestra es menor que el producido por la respectiva solución diluida tipo, la diferencia se resta del diámetro de inhibición de la solución diluida tipo T_3 . En la curva tipo trazada se leen las concentraciones correspondientes a estos diámetros de zona de inhibición corregidos. Para obtener el contenido del antibiótico en la muestra, la concentración encontrada se multiplica por

el factor apropiado de dilución.

Contenido de Kanamicina B. cuando más de 1.7%.

Solución tipo. Se disuelve una cantidad adecuada de sulfato ácido de kanamicina, patrón de referencia, en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 8.0, hasta obtener una concentración final equivalente a 1 mg de kanamicina por ml. Se conserva en refrigeración, no debe emplearse después de 7 días de preparado.

Muestra por valorar. En un tubo pequeño provisto de tapón esmerilado, se depositan 50 mg de la muestra de sulfato ácido de kanamicina, se agregan 2.5 ml de la solución 6N de ácido clorhídrico, el tubo se tapa y se mezcla. Se calienta en baño de vapor a 100°C, durante una hora y se enfría, se agregan 2 ml de solución 6 N de hidróxido de sodio y se diluye con solución amortiguadora estéril de fosfato de potasio 0.1M pH 8.0, hasta obtener una concentración final equivalente a 1 mcg/ml, de kanamicina.

Inóculo. Se emplea como microorganismo de prueba -- *Bacillus subtilis*, que se mantiene en el medio de cultivo para la determinación de la potencia, de la cepa original, desarrollada en agar inclinado, se toma la porción suficiente para inocular en una botella de Roux, que contenga aproximadamente 300 ml del mismo medio y se incuba durante 24 horas entre -- 32° y 35°C. Se prepara una suspensión de esporas de la manera siguiente: en una botella de Rous que contenga 300 ml del medio al que se ha agregado 300 mg por litro de sulfato de manganeso monohidratado, se mantiene el desarrollo del germen de prueba indicado, durante cinco días. Este cultivo de espo

ras se estabiliza por medio de calentamiento brusco (60°C) y enfriamiento brusco (0°C), el desarrollo de esporas en la superficie del medio de cultivo se lava con 50 ml de solución isotónica estéril y la suspensión se conserva bajo refrigeración hasta un mes. La concentración microbiana de dicha suspensión, se determina observando una alícuota diluida 1:20 con solución isotónica estéril, en un fotocolorímetro adecuado, - provisto con un filtro apropiado, o bien con un selector de - longitudes de onda, a 580 nm, utilizando como celdilla de absorción, un tubo de 13 mm de diámetro interno. Si la alícuota de la suspensión diluida, permite el paso del 25% de luz transmitida, la concentración de la suspensión de esporas es correcta.

Con frecuencia es necesario ajustar la concentración de suspensión de esporas diluyéndola hasta observar, en el fotocolorímetro mencionado, que una alícuota de la suspensión - ajustada diluida 1:20 con solución isotónica estéril, permite el paso del 25% de luz transmitida. Para la capa siembra, se usa la suspensión de esporas ajustada y no la alícuota diluida.

El volúmen de la suspensión ajustada de esporas, que se agrega a cada 100 ml del medio de cultivo, previamente fundido a 48°C y enfriado, se determina utilizando placas de prueba, hasta obtener zonas de inhibición de tamaño apropiado, -- claras y definidas.

Preparación de las placas: Se utiliza el mismo número de placas que se indica en el método para la valoración.

Preparación de la curva tipo. El día de la prueba

se diluye la solución tipo concentrada con solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.1M, pH entre 7.8 a 8.1, hasta obtener soluciones con las siguientes concentraciones: 0.64, -- 0.8, 1.0, 1.25. y 1.56, en mcg/ml.

Valoración. Se efectúa en la misma forma descrita en el método indicado para la valoración de potencia.

Cálculos. Por medio de la curva tipo se obtiene la potencia de la muestra de sulfato ácido de kanamicina ensayada correspondiente a los valores corregidos de las zonas de inhibición. La corrección de dichos valores se verifica con la potencia observada que se multiplica por 100 y se divide entre 126 para obtener la cantidad de kanamicina B en mg.

PRUEBA DE TOXICIDAD.

Utilizar ratones blancos sanos (todos de una misma cepa), que no hayan sido utilizados para otra prueba, y mantenidos con una dieta de alimento peletizado y agua. En el día de la prueba, utilizar sólo aquellos ratones que pesen no menos de 18 g, y no más de 25 g durante la prueba, cada grupo de ratones a los que se les ha administrado el sulfato ácido de kanamicina deberán separarse en una jaula aparte con su alimento peletizado y agua, debiendo permanecer a una temperatura ambiente de 25°C.

Para la prueba separar grupos de cinco ratones y -- administrar 0.5 ml de la solución de sulfato ácido de kanamicina por vía intravenosa en la cola de cada ratón utilizando agujas del n° 26 y a una velocidad de 0.05 ml/seg.

Preparar la muestra a una concentración de sulfato ácido de kanamicina equivalente a 2 mg/ml de kanamicina base.

Evaluación.- Observar los ratones por 48 horas, notar la mortalidad a las 24 horas, si algún ratón o más mueren antes de que termine el período de observación, repetir la prueba una o más veces utilizando para cada prueba cinco o más ratones (no utilizados anteriormente) con un peso de 20 (\pm 0.5 g) cada uno, si ningún ratón muere en el transcurso del período de observación la muestra pasa la prueba de toxicidad.

En el caso de que sea necesario repetir la prueba, el sulfato ácido de kanamicina pasa la prueba de toxicidad si el total de el número de animales de prueba, incluyendo la -- prueba inicial, no muere ningún otro ratón.

PRUEBA DE ESTERILIDAD.

La prueba se debe llevar a cabo utilizando técnicas asépticas en una area tan libre de contaminación como sea -- posible, sin la exposición directa a la luz ultravioleta durante la prueba. El método que se utiliza es el de filtración por membrana, de porosidad de $0.45\mu\text{m} \pm 0.2\mu\text{m}$, con un -- diámetro aproximado de 47 mm. con una fluidez de 55 a 75 ml por minuto/cm² de agua destilada, con ayuda de vacío a una -- presión de 5 cm. de Hg a 25°C.

Utilizar medios fluidos de tioglicolato y de soya - caseína digerida para la prueba, como diluyente se utiliza - el fluido A (peptona digerida 1 g en 1000 ml de agua).

Disolver 500 mg de sulfato ácido de kanamicina en - 100 ml de fluido A. y filtrar a través de la membrana circu-- lar, cortar en forma circular aproximadamente la mitad de la membrana y transferirla a un tubo de 38 por 200 mm (dimensio-- nes exteriores) conteniendo 90 ± 10 ml de medio estéril de -- tioglicolato.

Incubar el tubo por 7 días a 30-32°C, utilizando pin-- zas estériles; transferir la porción remanente de la membrana a un tubo similar conteniendo 90 ± 10 ml de medio estéril de soya caseína digerida. Incubar el tubo por 7 días a 22-25°C. Hacer la prueba por duplicado para cada lote de sulfato ácido de kanamicina y un blanco.

EVALUACION.

El sulfato ácido de kanamicina presenta los requeri-- mientos dela prueba si ninguna muestra presenta turbidez, si

algun tubo presenta turbidez, correr una segunda prueba en el medio apropiado, excepto que se hará por duplicado, o sea que una membrana dividida en dos partes se transferirá a dos tubos del mismo medio en el cual fué observada la turbidez.

El sulfato ácido de kanamicina presenta los requerimientos si en ningún tubo se observa turbidez al término de la prueba, así también los tubos del blanco patrón no deberán presentar turbidez, de no ser así se invalida y deberá realizarse nuevamente. (En ningún caso deberá ser justificado si hay suficiente razón para creer que los resultados obtenidos en la primera y segunda prueba no son válidos). El sulfato ácido de kanamicina analizado es satisfactorio si en la prueba final -- ningún tubo presenta turbidez.

PRUEBA DE PIROGENOS.

Utilizar conejos sanos de raza Nueva Zelanda, de -- ojos rojos que pesen no menos de 1.8Kg., los cuales han mantenido su peso con una dieta libre de antibióticos a través de una semana en condiciones ambientales, con separación de áreas individuales, con una temperatura ambiental uniforme - de 20°C (\pm 3°C) y libre de ruidos o algún factor que pueda -- excitarlos. No utilizar animales que se ocuparon en las -- últimas 48 horas, y si la muestra con la que fueron inyectados resultó pirogénica, debieron transcurrir dos semanas antes de la siguiente administración. Cada conejo antes de -- utilizarlo por primera vez, o después de esperar dos semanas posteriores a la administración de una muestra pirogénica, - se probarán durante tres días o una semana para verificar si su temperatura es estable, y se podrán utilizar.

Durante la prueba utilizar 3 conejos que se separarán en una área aparte, en cepos con agua para mantenerlos quietos durante el tiempo que dure la prueba; determinar la temperatura de control, introduciéndoles el termómetro en el recto de cada animal no menos de 7.5 cm hacia el interior esperando el - tiempo suficiente para que la temperatura no varíe más de 1°C y no exceda de 39.8°C.

El récord de temperaturas para cada conejo consta de - la temperatura inicial, desde la cual se registra que no haya - ningún aumento causado por el material.

Preparar la muestra de sulfato ácido de kanamicina a - una concentración equivalente a 10mg/ml de kanamicina disuelta en agua libre de pirogenos.

Calentar la solución aproximadamente a 37°C, inyectar por vía intravenosa a dosis de un ml. por kilogramo de peso del conejo, dentro de los 30 minutos subsecuentes a la lectura de la temperatura, llevar un record de temperaturas, a la primera, segunda y tercera horas subsecuentes a la inyección.

EVALUACION.

Si ningún conejo muestra un incremento individual de 0.6°C o más, y si la suma de los incrementos de las tres temperaturas no excede de 1.4°C, el sulfato ácido de kanamicina pasa los requerimientos de ausencia de pirógenos. Si uno o más conejos muestran un incremento de temperatura mayor de -- 0.6°C, o la suma de los incrementos es mayor a 1.4°C, repetir la prueba con un juego de cinco conejos.

Si no más de 3 de los ocho conejos muestran incremento que no exceda de los 0.6°C, y la suma de los incrementos -- no es mayor de 3.7°C la muestra pasa los requerimientos de -- ausencia de pirógenos.

CAPITULO IV

PARTE EXPERIMENTAL.

Se seleccionaron al azar 20 lotes de materia prima sulfato ácido de kanamicina, los cuales se determinaron las siguientes pruebas:

- 1) Descripción.
- 2) Identidad.
- 3) pH: (5.0-7.0).
- 4) Potencia: como mínimo 680mcg/mg. sobre base --- anhidra.
- 5) Pérdida al secado: No más de 4.5%.
- 6) Kanamicina B: máximo 1.7%.
- 7) Residuo a la ignición: máximo 0.5%.
- 8) Color de la solución: máximo 0.3.
- 9) Prueba de toxicidad.
- 10) Prueba de pirógenos.
- 11) Prueba de esterilidad.

Se hicieron cálculos estadísticos para calcular la media y el error para establecer los parámetros en cada una de las determinaciones.

Nota: cada cálculo en las determinaciones, para el límite se determinó redondeando las cantidades.

DETERMINACION DEL pH.

N° de lote	pH	$(x-\bar{x})$	$(x-\bar{x})^2$
1	5.8	0.395	0.156
2	5.8	0.395	0.156
3	6.4	0.205	0.042
4	6.6	0.41	0.1681
5	7.0	0.805	0.648
6	6.6	0.41	0.1681
7	7.0	0.805	0.648
8	7.0	0.805	0.648
9	5.3	0.895	0.8010
10	5.0	1.195	1.428
11	5.2	0.995	0.99
12	6.6	0.41	0.1681
13	7.0	0.805	0.648
14	5.3	0.895	0.801
15	5.8	0.395	0.156
16	6.6	0.41	0.1681
17	6.3	0.105	0.0102
18	5.5	0.695	0.483
19	5.1	1.09	1.18
20	<u>7.0</u>	0.805	<u>0.648</u>
	$\bar{x} = 6.195$		10.12

$$\sqrt{20} = 4.4 \quad \sqrt{\frac{10.12}{19}} = 0.729 \quad \frac{0.729 \times 3.883}{4.4} = 0.642$$

$$6.19 \pm 0.642 = 5.54-6.83$$

Por lo tanto los límites serán: pH de 5.0-7.0.

DETERMINACION DE POTENCIA.

N° de lote	potencia mcg/mg (base anhidra)	$(\bar{X}-X)$ n	$(\bar{X}-X)^2$ n
1	680.0	18.31	335.31
2	720.8	22.49	505.80
3	713.89	15.58	242.73
4	692.45	5.86	34.33
5	680.5	17.81	317.19
6	703.8	5.49	30.14
7	703.0	4.69	21.99
8	695.92	2.39	5.71
9	712.57	16.14	270.27
10	724.75	26.44	699.07
11	680.7	17.61	310.11
12	682.95	15.36	235.92
13	722.69	24.64	607.12
14	689.7	17.61	310.11
15	717.4	19.09	364.42
16	705.13	6.82	46.51
17	680.7	17.61	310.11
18	679.19	19.14	366.33
19	706.19	7.88	62.09
20	<u>683.2</u>	15.11	<u>228.31</u>
	$\bar{X} = 698.31$		5303.54

$$\sqrt{20} = 4.4 \quad \sqrt{\frac{5303.54}{19}} = 16.70 \quad \frac{16.7 \times 3.883}{4.4} = 14.74$$

$$6.98.3 - 14.74 = 683.56$$

$$6.98.3 + 14.74 = 713.04$$

Por tanto el límite será: mínimo 680 mcg/mg.

PERDIDA AL SECADO.

N° de lote	% de pérdida al secado.	$(\bar{X}-x)$ n	$(\bar{X}-x)^2$ n
1	4.5	1.65	2.72
2	3.98	1.13	1.27
3	4.36	1.51	2.28
4	2.36	0.49	0.24
5	0.32	2.53	6.40
6	4.4	1.55	2.40
7	0.13	2.72	7.39
8	1.61	1.24	1.53
9	0.81	2.04	4.16
10	4.26	1.41	1.98
11	4.45	1.6	2.56
12	0.0	2.85	8.12
13	1.91	0.94	0.88
14	3.58	0.73	0.53
15	4.4	1.55	2.40
16	3.85	1.0	1.0
17	4.39	1.54	2.37
18	0.91	1.94	3.76
19	3.58	0.73	0.53
20	3.39	0.54	0.291
	2.85		52.81

$$\sqrt{20} = 4.4 \quad \sqrt{\frac{52.81}{19}} = 1.66 \quad \frac{1.65 \times 3.883}{4.4} = 1.47$$

$$2.85 \pm 1.47 = 1.38-4.32$$

En base a los cálculos realizados se obtuvo no más de 4.32%,
para especificaciones se redondea a no más de 4.5%-

DETERMINACION DE KANAMICINA B.

N° de lote	% de kanamicina B.	$(\bar{X}-X_n)$	$(\bar{X}-X_n)^2$
1	1.104	0.0608	0.0036
2	0.632	0.5280	0.278
3	0.03	1.13	1.276
4	1.5	0.34	0.1156
5	1.58	0.42	0.176
6	1.2	0.04	0.0016
7	0.44	0.72	0.5184
8	1.62	0.46	0.2116
9	1.25	0.09	0.0081
10	1.38	0.22	0.048
11	0.78	0.38	0.144
12	1.7	0.54	0.2916
13	1.6	0.44	0.1936
14	1.4	0.24	0.0576
15	1.7	0.54	0.2916
16	1.58	0.42	0.1764
17	0.5	0.66	0.435
18	1.7	0.54	0.2916
19	0.1	1.06	1.123
20	<u>1.7</u>	0.54	<u>0.2916</u>
	1.16		5.9329

$$\sqrt{20} = 4.4 \quad \sqrt{\frac{5.9329}{19}} = 0.5588 \quad \frac{0.5588 \times 3.883}{4.4} = 0.493$$

$$1.16 \pm 0.493 = 0.667 - 1.65\%$$

En base a los cálculos realizados se obtuvo que el contenido de kanamicina B no debe ser mayor a 1.65%.

RESIDUCS A LA IGNICION.

Nº de lote	Res. de ignición. %	$(\bar{X}-X)$ n	$(\bar{X}-X)^2$ n
1	0.40	0.0962	0.0092
2	0.23	0.0730	0.0053
3	0.36	0.0240	0.00057
4	0.45	0.147	0.0216
5	0.39	0.087	0.0075
6	0.37	0.067	0.0044
7	0.4	0.097	0.0094
8	0.45	0.147	0.0216
9	0.0	0.303	0.0918
10	0.11	0.193	0.0372
11	0.225	0.073	0.00608
12	0.300	0.003	0.0
13	0.0	0.303	0.0918
14	0.0	0.303	0.0918
15	0.41	0.107	0.0114
16	0.44	0.137	0.0187
17	0.4	0.097	0.0094
18	0.35	0.047	0.0022
19	0.39	0.087	0.0075
20	<u>0.41</u>	0.107	<u>0.0114</u>
	$\bar{X} = 0.303$		0.64961

$$\sqrt{20} = 4.4 \quad \sqrt{\frac{0.64961}{19}} = 0.1849 \quad \frac{0.1849 \times 3.883}{4.4} = 0.1630$$

$$0.303 \pm 0.163 = 0.14-0.466$$

En la base a los cálculos realizados se obtuvo no más de --
0.466%, para especificaciones se redondea a no más de 0.5%.

DETERMINACION DE EL COLOR DE LA SOLUCION.

Nº de lote	color	$(\bar{X}-X_n)$	$(\bar{X}-X_n)^2$
1	0.29	0.078	0.006
2	0.3	0.088	0.0077
3	0.212	0	0.0
4	0.250	0.038	0.0014
5	0.230	0.018	0.0003
6	0.260	0.048	0.0023
7	0.300	0.088	0.0077
8	0.205	0.007	0.0
9	0.260	0.048	0.0023
10	0.210	0.002	0.0
11	0.100	0.112	0.0125
12	0.196	0.016	0.0002
13	0.054	0.158	0.0240
14	0.080	0.132	0.0170
15	0.214	0.002	0.0
16	0.280	0.068	0.0040
17	0.300	0.080	0.0077
18	0.200	0.012	0.0
19	0.100	0.112	0.0125
20	<u>0.213</u>	<u>0.001</u>	<u>0.0</u>
	$\bar{X} = 0.212$		0.1056

$$\sqrt{20} = 4.4 \quad \sqrt{\frac{0.1056}{19}} = 0.0745 \quad \frac{0.0745 \times 3.883}{4.4} = 0.065$$

$$0.212 \pm 0.065 = 0.147 - 0.277$$

Por tanto el límite será: máximo 0.300

CAPITULO V

CONCLUSIONES.

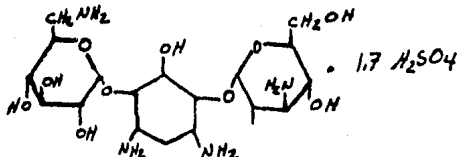
1.- Los métodos efectuados para cada una de las determinaciones fueron confiables estadísticamente.

2.- Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad del sulfato ácido de kanamicina fueron determinados estadísticamente obteniéndose una actividad promedio de 698.0 mcg/mg (sobre la base anhidra), en comparación con la actividad reportada para el sulfato de kanamicina que es de 750.0 mcg/mg.

3.- Este estudio puede considerarse como una proposición de monografía para ser incluida en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos en su próxima edición.

CAPITULO VI
PROPOSICION COMO MONOGRAFIA A LA FARMACOPEA NACIONAL
DE -LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS.

SULFATO ACIDO DE KANAMICINA.



Contiene el equivalente a no menos del 68 por ciento de kanamicina ($C_{18}H_{36}N_4O_{11}$), con actividad antibiótica correspondiente a 680 mcg/mg, y no más del 1.7 por ciento de kanamicina B, calculado sobre base anhidra.

Descripción:

Polvo cristalino, blanco inodoro.

Solubilidad:

Muy soluble en agua, insoluble en alcohol, acetona, acetato de etilo y benceno.

Ensayos de identidad:

Responde a la prueba de identidad para sulfato ácido de kanamicina. Se disuelven 10 mg de la muestra en 1 ml -

de agua, se agrega 1 ml de solución 1:500 de hidrato de tri--
ceto-hidrindeno en alcohol butílico normal y 0.5 ml de piridi-
na. En baño de vapor se calienta durante cinco minutos y se
agregan 10 ml de agua; se produce coloración púrpura oscura.

Residuos a la Ignición: No más de 0.5%.

En un crisol de porcelana puesto previamente a peso
constante se depositan aproximadamente 1 g de muestra. Se in-
cinera a baja temperatura hasta carbonización completa, duran-
te la cual se puede cubrir parcialmente con una tapa de porce-
lana. Se deja enfriar y en seguida se agregaron 2 ml de ácido
sulfúrico y cinco gotas de ácido nítrico. Se calienta con --
precaución hasta que se produzcan humos blancos. Inmediatamen-
te se incinera entre 500° a 600°C en una mufla, hasta incine-
ración total. El crisol se enfría en un desecador y se pesa.

Agua: No más de 4.5%.

Pesar 100 mg de muestra de sulfato ácido de kanami-
cina finamente pulverizada en un pesafiltros previamente a pe-
so constante. Colocarla en una estufa al vacío a temperatura
de 60°C durante tres horas, enfriar en un desecador y pesar.

pH: 5.0-7.0

Antes de verificar la medición del pH de una solu-
ción, el aparato se ajusta determinando el pH de dos solucio-
nes amortiguadoras tipo, cada una con un pH cercano al que se

supone tiene la muestra por valorar, de tal modo que este puede quedar en la medida de las dos soluciones una diferencia - entre sí con un máximo de dos unidades de pH. Si el producto observado difiere en más de 0.05 unidades de pH el valor conocido, se hacen los ajustes necesarios; hay que verificar por lo menos dos mediciones de una misma solución, si se obtienen resultados diferentes es necesario repetir las hasta obtener una medición correcta. Después de cada prueba los electrodos deben mantenerse sumergidos en agua.

De una solución al 10%, de sulfato ácido de kanamicina, en agua destilada libre de bióxido de carbono y a 25°C es medida directamente con el potenciómetro.

Color de la solución. No debe ser mayor de 0.300.

Se disuelven 2.8 g de la muestra de sulfato ácido - de kanamicina en 8 ml de agua destilada, se filtra por papel Whatman # 5, determinar la absorbancia a 400 MM.

Valoración. Contiene no menos de 680 mcg/mg sobre - la base anhidra.

Material y equipo de laboratorio:

Cilindros. Se usan cilindros de acero inoxidable - con un diámetro exterior de 8 mm, diámetro interior de 6 mm y longitud de 10 mm \pm 1 mm en todas las medidas.

Placas. Se usan cajas Petri de plástico o de vidrio de 20 x 100 mm. Las cubiertas de las cajas pueden ser de porcelana vidriada, pero únicamente en su parte exterior.

Deben ser lavadas con suficiente frecuencia para -
mantenerlas limpias y estériles al horno y se utilizan frías.

Solución amortiguadora diluyente de fosfatos:

Fosfato de potasio 0.1 M., pH 8.0 (después de este-
rilización). Se disuelven 16.73 g de fosfato de potasio dibá-
sico y 0.523 g de fosfato de potasio monobásico en agua hasta
1000ml. La solución se ajusta con solución 10 N de hidróxido
de potasio o con solución 18 N de ácido fosfórico, según sea
necesario, para que después de la esterilización el pH sea de
7.9-8.1.

Medios de cultivo.

Peptona	6.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de carne	1.5 g
Digerido pancreático de caseína	4.0 g
Glucosa	1.0 g
Agar	15.0 g
agua destilada cbp.....	1,000 ml

pH después de esterilización a 121°C durante 30 minutos: 7.9-8.1

Germen de prueba.

Staphylococcus aureus.

Método de preparación.

Preparación de la suspensión: el organismo de prueba
se mantiene en agar inclinado, al que se le agregan 10 ml del
medio ya mencionado y se incuba entre 32°-35°C durante 24 ho-

ras. El desarrollo se lava con 3 ml de S.R. salina estéril y se pasa a una botella de Roux que contenga 250 ml del medio. La suspensión del organismo se extiende sobre toda la superficie del agar con la ayuda de cuentas de vidrio estériles e inclinaciones a ambos extremos, se incuba entre 32°-35°C y el desarrollo resultante se lava con 50 ml de solución isotónica estéril.

Ajuste de la suspensión: se utiliza un fotocolorímetro adecuado y un tubo de 13 mm de diámetro interno como celdilla de absorción. Una alícuota de la suspensión se ajusta diluyéndola hasta obtener un 25% de transmisión de luz, a una longitud de onda de 580 MM y con este dato, se ajusta el volumen total de la suspensión. Se determina el volumen de la suspensión ajustada; se agregará a cada 100 ml de agar o del medio de cultivo adecuado, por medio de pruebas en placas o en tubos.

La suspensión del germen de prueba se conserva en refrigeración durante una semana.

Preparación de las placas.

Se usa el mismo medio para la capa base como para la capa sembrada. Con una cantidad de 21 ml para la capa base y 4 ml para la capa siembra por cada una de las placas.

A la capa sembrada se agregan 0.4 ml del inóculo de *Staphylococcus aureus* en solución isotónica al 25% de transmitancia por 100 ml del medio incubándose entre 32° a 35°C.

Preparación de las soluciones concentradas y diluidas tipo:

Se pesa una porción con exactitud del antibiótico -

patrón de referencia, se disuelve preparando la solución concentrada tipo a 1 mg/ml. (Debe conservarse en refrigeración - no más de 30 días).

Para la preparación de las soluciones diluidas tipo de concentraciones diferentes que son para T_1 de 3.2 mcg/ml, - para la T_2 de 4.0 mcg/ml, para la T_3 de 5.0 mcg/ml, para la T_4 de 6.25 mcg/ml, para la T_5 de 7.81 mcg/ml, que son alícuotas a 100 ml con la solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.8.

La solución diluida tipo óptima para la comparación dentro de la valoración, es aquella cuya concentración corresponde a la dilución media entre las soluciones diluidas tipo o T_3 .

Preparación de la solución concentrada diluida de - sulfato ácido de kanamicina muestra.-

El disolvente usado en la muestra es el mismo que - para la solución tipo, la solución se prepara con una alícuota de la solución concentrada para llegar a una concentración final estimada de 5 mcg/ml (similar a la T_3).

Valoración.-

Se preparan las placas inoculadas como sigue: la capa base se prepara agregando el volumen de agar (21 ml) indicado anteriormente para cada caja petri.

Se distribuye uniformemente y se deja solidificar - de manera que se forme una superficie plana y lisa. La capa sembrada se prepara agregando el inóculo ajustado el germen - de prueba a la cantidad suficiente que ha sido fundida y enfriando entre 48°-50°C y agitando el matraz que lo contiene -

con movimiento rotatorio para obtener una suspensión homogénea sin inocular. A cada una de las placas con la capa sin inocular se agregan 4 ml de agar sembrado, extendiéndolo uniformemente sobre toda la superficie. Las cajas se cubren con sus tapas de porcelana vidriada en su parte exterior. Cuando la superficie de agar sembrado (inoculado) se ha solidificado, se colocan en cada una de las placas 6 cilindros, de manera que queden separados entre sí, en forma radial, a intervalos de 60°, a una distancia del eje de 2.8 cm.

En la elaboración de la curva tipo, se usa un total de 12 placas, 3 para cada solución diluída tipo, excepto para la solución diluída tipo óptima (cuya concentración corresponde a la dilución media ó T_3), con la cual se llenan 3 cilindros con una de las otras soluciones diluídas tipo. De esta manera en las 12 placas habrá 36 zonas de inhibición para cada una de las otras 4 soluciones tipo (T_1, T_2, T_4, T_5).

Para cada muestra problema por valorar se usan tres placas. En cada una se colocan 6 cilindros, los cuales se llenan, alternando así 3 con la solución de la muestra problema, cuya concentración estimada corresponda a la solución diluída tipo óptima. De esta manera habrá 9 zonas de inhibición, tanto para la solución diluída óptima, como para la solución de la muestra que se está valorando.

Después de que todas las placas han sido incubadas a la temperatura apropiada entre 16 y 24 horas, se miden los diámetros de la zona de inhibición, por medio de una regla con divisiones en milímetros, o un calibrador o un proyector óptico.

Estimación de la potencia.-

Para preparar la curva tipo se promedian en cada una de las 4 series formadas por tres placas cada serie, los diámetros de las zonas de inhibición correspondientes a la solución diluida tipo óptima T_3 y los 9 diámetros de las zonas de inhibición de cada una de las soluciones tipo de cada serie - (T_1 , T_2 , T_4 , T_5); también se promedian los 36 diámetros de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo óptima T_3 , correspondientes a las 4 series y el promedio obtenido es la base para la corrección. Si cada uno de los 4 promedios de la T_3 de cada serie, son iguales al promedio base de corrección, no es necesario hacer correcciones en los promedios individuales.

Sirve como ejemplo la corrección que corresponde a la zona de inhibición de la solución diluida tipo, de mayor concentración T_5 . Si el promedio base de corrección es de -- 18.0mm (promedio de los 36 diámetros de las zonas de inhibición de las soluciones diluidas tipo T_3), y el promedio de -- los 9 diámetros de las zonas de inhibición de la misma solución T_3 , de la serie respectiva de 3 placas, es de 17.8 mm, la corrección es de 0.2mm. Si el promedio de los diámetros de -- la misma serie, correspondiente a la solución diluida tipo T_5 es de 17 mm, el valor correcto es de 17.2 mm. Con los diámetros corregidos de las zonas de inhibición de las soluciones diluidas tipo (T_1 , T_2 , T_3 , T_4 , T_5) incluyendo el promedio de los 36 diámetros correspondientes a las zonas de inhibición -- de la solución diluida tipo, óptima (T_3) y las concentraciones del antibiótico respectivo, en mcg/ml, se traza la curva tipo en papel semilogarítmico de 2 ciclos, anotando en las -- aboissas los diámetros de las zonas de inhibición de la solu --

ción diluida tipo, ótima (T_3) y las concentraciones del antibiótico, en mcg/ml, se traza la curva tipo en papel semilogarítmico de dos ciclos, anotando en las abcisas los diámetros de las zonas de inhibición y en las ordenadas, las concentraciones del antibiótico.

La curva se traza a través de estos puntos o bien se unen los puntos correspondientes a las zonas de inhibición de diámetro más alto obtenidas por medio de las siguientes -- ecuaciones:

$$B = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

$$A = \frac{3e + 2d + c - a}{5}$$

de donde :

B es el diámetro calculado, en milímetros para la zona de inhibición de la solución tipo diluida de más baja -- concentración T_1 . A diámetro calculado, en milímetros, para la zona de inhibición de la solución tipo diluida de más alta concentración T_5 . c diámetro promedio, en milímetros, de las zonas de inhibición de las 36 lecturas de la solución tipo -- diluida optima (T_3), en las 4 series.

a, b, d, e diámetros promedio corregidos, en milímetros, de las zonas de inhibición de las otras cuatro soluciones tipo diluidas, (T_1 , T_2 , T_4 y T_5).

Para determinar la potencia de la muestra se promedian los diámetros de las nueve zonas de inhibición de las 3 placas usadas, tanto en la solución diluida tipo T_3 , como en

solución de la muestra problema. Si el diámetro promedio de las zonas de inhibición de la muestra, es mayor que el diámetro promedio de las zonas de inhibición de la solución diluida tipo respectiva, la diferencia se suma al diámetro de la zona de inhibición de la solución diluida tipo T_3 . Si el diámetro promedio de las zonas de inhibición de la muestra es menor que el producido por la respectiva solución diluida tipo, la diferencia se resta del diámetro de inhibición de la solución diluida tipo T_3 . En la curva tipo trazada se leen las concentraciones correspondientes a estos diámetros de zona de inhibición corregidos. Para obtener el contenido de antibiótico en la muestra, la concentración encontrada se multiplica por el factor apropiado de dilución.

Contenido de kanamicina B. Máximo 1.7%

Solución tipo. Se disuelve una cantidad adecuada de sulfato ácido de kanamicina, patrón referencia, en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 8.0, hasta obtener una concentración final equivalente a 1 mg de kanamicina por ml. Se conserva en refrigeración, no debe emplearse después de siete días de preparado.

Muestra por valorar.-

En un tubo pequeño provisto con tapón esmerilado, se depositan 50 mg de la muestra de sulfato de kanamicina, se agregan 2.5 ml de la solución 6N de ácido clorhídrico, el tubo se tapa y se mezcla. Se calienta en baño de vapor a 100°C, durante una hora y se enfría, se agregan 2 ml de solución 6 N de

hidróxido de sodio y se diluye con solución amortiguadora estéril de fosfato de potasio 0.1 M pH 8.0, hasta obtener una concentración final equivalente a 1 mcg/ml, de kanamicina.

Inóculo.-

Se emplea como microorganismo de prueba *Bacillus subtilis*, que se mantiene en el medio de cultivo para la determinación de potencia, de la cepa original, desarrollada en agar inclinado, se toma la porción suficiente para inocular en una botella de Roux, que contenga aproximadamente 300 ml. del mismo medio y se incuba durante 24 horas entre 32° y 35°C. Se prepara una suspensión de esporas de la manera siguiente: en una botella de Roux que contenga 300 ml del medio al que se ha agregado 300 mg por litro de sulfato de manganeso monohidratado, se mantiene el desarrollo del germen de prueba indicado, durante cinco días. Este cultivo de esporas se estabiliza por medio de calentamiento brusco (60°C) y enfriamiento brusco (0°C), el desarrollo de esporas en la superficie del medio de cultivo se lava con 50 ml de solución isotónica estéril y la suspensión se conserva bajo refrigeración hasta una semana. La concentración microbiana de dicha suspensión, se determina observando una alícuota diluida 1:20 de solución isotónica estéril, en un fotocolorímetro adecuado, provisto con un filtro apropiado, o bien con un selector de longitudes de onda, a 580 MM, utilizando como celdilla de absorción, un tubo de 13 mm de diámetro interno. Si la alícuota de la suspensión diluida, permite el paso de el 25% de luz transmitida, la concentración de la suspensión de esporas es correcta.

Con frecuencia es necesario ajustar la concentración de la suspensión de esporas diluyéndola hasta observar, en el fotocolorímetro mencionado, que una alícuota de la suspensión ajustada diluida 1:20 con solución isotónica estéril, permite el paso del 25% de luz transmitida. (Para la capa siembra, se usa la suspensión de esporas ajustada y no la alícuota diluida).

El volúmen de la suspensión ajustada de esporas, que se agrega a cada 100 ml del medio de cultivo, previamente fundido a 48.C y enfriado, se determina utilizando placas de prueba, hasta obtener zonas de inhibición de tamaño apropiado, claras y definidas.

Preparación de las placas.-

Se utiliza el mismo número de placas que se indica en el método para la valoración.

Preparación de la curva tipo.-

El día de la prueba se diluye la solución tipo concentrada con solución amortiguadora de fosfato de potasio -- 0.1M. pH 8.0, hasta obtener soluciones con las siguientes concentraciones: 0.64, 0.8, 1.0, 1.25, y 1.56, en mcg/ml.

Valoración.- Se efectúa de la misma forma descrita en el método indicado para la valoración de potencia.

Cálculos.-

Por medio de la curva tipo se obtiene la potencia de la muestra del sulfato ácido de kanamicina ensayada correspondiente a los valores corregidos de las zonas de inhibición.

La corrección de dichos valores se verifica con la potencia observada que se multiplica por 100 y se divide entre 126 para obtener la cantidad de kanamicina B en mg.

Prueba de toxicidad:

Utilizar ratones blancos sanos (todos de una misma cepa), que no hayan sido utilizados para otra prueba, y mantenidos con una dieta de alimento peletizado y agua. El día de la prueba, utilizar sólo aquéllos ratones que pesen no menos de 18 g y no más de 25 g, durante la prueba, cada grupo de -- ratones a los que se les ha administrado la kanamicina sulfato ácido deberán separarse en una jaula aparte con su alimento peletizado y agua, debiendo permanecer a una temperatura ambiental de 25°C.

Para la prueba separar grupos de cinco ratones y administrar 0.5 ml de la solución de sulfato ácido de kanamicina por vía intravenosa en la cola de cada ratón utilizando agujas del n° 26 y a una velocidad de 0.05ml/seg.

Preparar la muestra a una concentración de sulfato ácido de kanamicina equivalente a 2 mg/ml de kanamicina base.

Evaluación.--

Observar los ratones por 48 horas, notar la mortalidad a las 24 horas, si algún ratón o más mueren antes de que termine el período de observación, repetir la prueba una o -- más veces utilizando para cada prueba cinco o más ratones (no utilizados anteriormente) con un peso de 20 g (\pm 0.5g) cada uno, si ningún ratón muere en el transcurso del período de obser

vación la muestra pasa la prueba de toxicidad.

En el caso de que sea necesario repetir la prueba, la kanamicina sulfato ácido pasa la prueba de toxicidad si el total de el número de ratones muertos no es mayor del 10% de el total de el número de animales de prueba, incluyendo la -- prueba original.

Prueba de esterilidad. Estéril.

La prueba se debe llevar a cabo utilizando técnicas asépticas en un área tan libre de contaminación como sea posible, sin la exposición directa a la luz ultravioleta durante la prueba. El método que se utiliza es el de filtración por membrana, de porosidad de $0.45 \text{ mm} \pm 0.2 \text{ mm}$, con un diámetro - aproximado de 47 mm con una fluidez de 55 a 75 ml por minuto por cm^2 de agua destilada, con ayuda de vacío a una presión de 5 cm de Hg a 25°C .

Utilizar medios fluidos de tioglicolato y de soya - caseína digerida para la prueba, como diluyente se utiliza el fluido A (peptona digerida 1 g en 100 ml de agua).

Disolver 500 mg de sulfato ácido de kanamicina en - 100 ml de fluido A y filtrar a través de la membrana circular, cortar en forma circular aproximadamente a la mitad de la membrana y transferirla a un tubo de 38 por 200mm (dimensiones - exteriores) conteniendo 90 ± 10 ml de medio estéril de tioglicolato.

Incubar el tubo por 7 días a $30^\circ\text{--}32^\circ\text{C}$, utilizando -

Evaluación.

El sulfato ácido de kanamicina presenta los requerimientos de la prueba si ninguna muestra presenta turbidez; si algún tubo presenta turbidez, correr una segunda prueba en el medio apropiado, excepto que se hará por duplicado, o sea que una membrana dividida en dos partes se transferirá a dos tubos del mismo medio en el cual fué observada la turbidez.

El sulfato ácido de kanamicina presenta los requerimientos si en ningún tubo se observa turbidez al término de la prueba, así también los tubos del blanco patrón no deberán presentar turbidez, de no ser así se invalida y deberá realizarse nuevamente. (En ningún caso deberá ser justificado si hay suficiente razón para creer que los resultados obtenidos en la primera y segunda pruebas no son válidos). El sulfato ácido de kanamicina analizada es satisfactoria si en la prueba final ningún tubo presenta turbidez.

Prueba de pirógenos. Libre de pirógenos.

Utilizar conejos sanos de raza Nueva Zelanda, de -- ojos rojos que pesen no menos de 1.8 Kg, los cuales han mantenido su peso con una dieta libre de antibióticos a través -- de una semana en condiciones ambientales con separación de -- áreas individuales con una temperatura ambiental uniforme de 20°C (\pm 3°C) y libre de ruidos o algún factor que pueda excitarlos. No utilizar animales que se ocuparon en las últimas 48 horas, si la muestra con la que fueron inyectados resultó pirogénica, debieron transcurrir dos semanas antes de la siguiente administración.

Cada conejo antes de utilizarlo por primera vez, o después de esperar dos semanas posteriores a la administración de una muestra pirogénica, se probarán durante tres días o una semana para verificar si su temperatura es estable, y se podrán utilizar.

Durante la prueba utilizar 3 conejos que se separarán en una área aparte, en cepos con agua para mantenerlos -- quietos durante el tiempo que dure la prueba; determinar la -- temperatura de control, introduciéndoles el termómetro en el recto de cada animal no menos de 7.5 cm hacia el interior esperando el tiempo suficiente para que la temperatura máxima -- quede registrada. Utilizar conejos cuya temperatura no varíe más de 1°C y no exceda de 39.8°C.

El récord de temperaturas para cada conejo consta -- de la temperatura inicial desde la cual se registra que no -- haya ningún aumento causado por el material.

Preparar la muestra de sulfato ácido de kanamicina a una concentración equivalente a 10 mg/ml de kanamicina disuelta en agua libre de pirógenos.

Calentar la solución aproximadamente a 37°, inyec-- tar por vía intravenosa a dosis de un ml por kilogramo de peso del conejo, dentro de los 30 minutos subsiguientes a la lectura de la temperatura, llevar un récord de temperaturas, a -- la primera, segunda y tercera horas subsiguientes a la inyección.

Evaluación.-

Si ningún conejo muestra un incremento individual -- de 0.6°C o más, y si la suma de los incrementos de las tres -- temperaturas no excede de 1.4°C, el sulfato ácido de kanami--

cina pasa los requerimientos de ausencia de pirógenos. Si uno o más conejos muestran un incremento de temperatura mayor de 0.6°C , o la suma de los incrementos es mayor a 1.4°C , repetir la prueba con un juego de cinco conejos.

Si no más de 3 de los ocho conejos muestran incremento que no excede de los 0.6°C , y la suma de los incrementos es menor de 3.7°C la muestra pasa los requerimientos de ausencia de pirógenos.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Farmacología. Goth Andres. 1966. (p. 481-508).
- 2.- Extra Pharmacopoeia. Martindale, William. (1840-1892) (p.1143-1146).
- 3.- Jacovella G. Kanamicina. Cl. Terap. (1958), 15, 383-8.
- 4.- Journal of Pharmaceutical Science, Vol, N° 11, November, 1971.
By American Pharmaceutical Association.
- 5.- Enciclopedia Farmacéutica Tomo III. Métodos Analíticos de Identificación y Valoración. (p. 669-778).
- 6.- Quantitative Analisis. V. Aleveyev. 1979. 2° Ed. (p. 51-57).
- 7.- Clinical Studies by Profesor Nobuyuki Yoshida Azabu Veterinary-College. Meiji Seika Kaisha. LTD. N° 8, 2-Chome, Kyobashi, Chao-Ku, Tokyo, Japan.
- 8.- Chapter 1 - Food and Drug Administration. 436.31 (1980) (Part-300 to 499).
- 9.- Berger S.H., Wehrle P.F. Kanamycin serum levels in infants and children. Ann. N.Y. Acad. Sci. (1958) 76,136-9.
- 10.- Bunn P.A. Baltch A. Clinical experiences with Kanamycin. New Engl. J. Med. (1958) 259, 659-62.
- 11.- Bunn. P.A. Baltch a. Clinical experiences with Kanamycin. Ann. N.Y. Acad. Sci (1958), 76,109-21.
- 12.- Courtieu A.L. Longerey C., Colombet M.F., Badiou A. Le spectre antibactérien actuel de la Kanamycine. Ann. Inst. Pateur (1962). 102, 192-8.
- 13.- Cron. M.J., Fadig O.B., Johnson D.L., White-head D.F., Hooper I.R., Lemieux R.V. Kanamycin IV. The estructura of Kanamycin. J. Amer. chem. Soc. (1958) 80,4115.
- 14.- Endo K., Takashaslic M., Hashimoto H., Mitsuhashi S. Kanamycin resistant tubercle bacilli isolated from the in-patients afflicted with pulmonary tuberculosis. J. Antibiotics, Ser, A. (1967), 20-127.
- 15.- Finland M. Kanamycin. Lancet (1958) II, 209-11.
- 16.- Frost J.O., Daly J.F., Hawkins J.E. Jr. The ototoxicity of kanamycin in man. Antibiotic. Ann. (1958-59), 700-07.
- 17.- Quantitative Analisis. V. Alexeyev. Moscow. 2° Ed. English Translation, Mir Publishers, 1979. (p. 48-57).

- 18.- U.S. Pharmacopeia XX. N.F. XV. July, 1980. (436).
- 19.- The Merck Index. Tenth edition. (1983).
- 20.- British Pharmacopoeia 1973. (258).
- 21.- Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. (1974)
4° Ed. (p. 925-926).
- 22.- Koroleva. V.G. The absorption, distribution, and excretion of
kanamycin in the animal organism. Antibiotiki (1967), 12, 714-4.
- 23.- Nephrotoxicity of antibiotics. J. Amer. med. Ass. (1967), 202, -
204-8.
- 24.- Morikubo Y. Bacteriological studies of kanamycin. I. antibacte-
rial spectrum and one-way cross resistance of E. coli with --
streptomycin. J. Antibiotics Ser A (1958), 11, 171-80.