

31
29

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



DESARROLLO DE UN METODO ANALITICO MICROBIOLOGICO PARA LA CUANTIFICACION DE CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA EN UNA FORMULACION DE USO VETERINARIO



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
AURELIO 3o. DE GYVES LOPEZ LENA
MEXICO, D. F. 1988



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.

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION -----	1
II. GENERALIDADES -----	3
II.1 FARMACO -----	3
A. HISTORIA -----	3
B. PROPIEDADES -----	5
a) Oxitetraciclina base -----	5
b) Oxitetraciclina clorhidrato -----	8
C. ESTABILIDAD -----	12
D. VIAS DE DEGRADACION -----	13
a) Degradación con formación de epímeros -----	13
b) Degradación en medio ácido -----	15
c) Degradación en medio básico -----	19
d) Degradación reductiva -----	21
E. FARMACOLOGIA -----	23
a) Indicaciones -----	23
b) Mecanismo de acción -----	24
c) Farmacocinética -----	25
d) Interacciones con otros fármacos -----	26
F. TOXICIDAD -----	27
G. METODOS ANALITICOS -----	28
a) Métodos espectrofotométricos -----	29

	Página
b) Métodos fluorométricos -----	30
c) Métodos cromatográficos -----	31
d) Volumetría -----	37
e) Polarimetría -----	37
II.2 METODO MICROBIOLÓGICO -----	38
A. INTRODUCCION -----	38
B. FUNDAMENTO Y DESCRIPCIÓN -----	39
a) Fundamento -----	35
b) Descripción -----	40
C. ESTUDIO DE VARIABLES -----	41
a) Intervalo de concentraciones de las soluciones estándar -----	42
b) Presencia de sustancias inhibidoras -----	44
c) Estabilidad -----	44
d) Solubilidad -----	44
e) Concentración de la suspensión microbiana -	45
f) Fase de crecimiento -----	46
g) Duración del período de incubación -----	47
h) Temperatura de incubación -----	48
D. METODOS REPORTADOS -----	50
III. DESARROLLO EXPERIMENTAL -----	52
III.1 METODO TURBIDIMÉTRICO GENERAL -----	52
A. REACTIVOS Y EQUIPO -----	52

	Página
B. PROCEDIMIENTO -----	52
III.2 ESTUDIO DE VARIABLES -----	54
A. DESCRIPCION DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO -----	56
B. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA SUSPENSION MICROBIANA, TIEMPO DE INCU- BACION EN EL MEDIO LIQUIDO PREVIO AL ANALISIS Y TIEMPO DE INCUBACION -----	57
a) Estudio de interacción de las variables --	57
b) Determinación de la concentración óptima de la suspensión microbiana -----	80
c) Determinación del tiempo de incubación óptimo -----	83
C. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO EN EL MEDIO DE RESIEMBRA -----	85
D. ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA DE RESIDUOS CONTAMINANTES -----	91
E. ESTUDIO DE LA SOLUBILIDAD DE CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA EN LA ELECCION DEL DISOLVEN- TE -----	96
III.3 ESPECIFICIDAD -----	98
III.4 VALIDACION -----	99
A. EXACTITUD -----	101

	Página
B. LINEARIDAD -----	101
C. REPETIBILIDAD -----	104
D. REPRODUCIBILIDAD -----	105
III.5 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL METODO ANALITICO EN LA DETERMINACION DE CLORHIDRATO DE OXITETRA- CICLINA DURANTE EL PROCESO DE SU DEGRADACION ----	106
A. ESTUDIO PRELIMINAR. ANALISIS DE MUESTRAS MONTADAS EN ESTABILIDAD ACELERADA -----	107
B. ESTUDIO DEL METODO ANALITICO. ANALISIS DE MUESTRAS DE CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA EN DISTINTAS ETAPAS DEL PROCESO DE SU DE- GRADACION -----	109
IV. RESULTADOS FINALES -----	116
IV.1 METODO ANALITICO -----	116
A. REACTIVOS Y EQUIPO -----	116
B. PROCEDIMIENTO -----	116
C. CALCULOS -----	119
V. CONCLUSIONES -----	120
VI. BIBLIOGRAFIA -----	124

I. INTRODUCCION.

Hoy en día uno de los principales objetivos de la industria farmacéutica es el desarrollo de nuevos y más eficaces medicamentos para su empleo en la práctica médica. Para tratar de alcanzar este objetivo se invierten cuantiosos recursos, tanto en estudios de formulación como en el desarrollo de métodos analíticos adecuados que permitan la cuantificación del principio activo en el producto.

Siempre que un medicamento va a lanzarse al mercado es indispensable además de verificar propiedades características de la forma farmacéutica, hacer un análisis cuantitativo del principio activo con el fin de poder asegurar la eficacia y seguridad del medicamento.

Dependiendo de su fundamento, los métodos de análisis cuantitativos pueden ser de distintos tipos, tales como métodos químicos, fisicoquímicos y microbiológicos. Los métodos microbiológicos pueden ser de 2 tipos, dependiendo de su fundamento; cilindro placa y turbidimétricos; y son usados para la cuantificación de antibióticos y vitaminas. Estos métodos se sabe que son muy sensibles y son influenciados por numerosas variables, la bibliografía disponible no informa acerca de la forma para poder evaluar dicha influencia.

OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo de este trabajo fue estudiar cuidadosamente las variables que ejercen influencia en un método microbiológico tur-

bidimétrico, refiriéndose estas variables a: la concentración de la suspensión microbiana, el tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis, la duración del período de incubación, el tiempo de previa resiembra, la influencia de residuos orgánicos e inorgánicos, la elección del disolvente, etc.

En base al estudio de variables anterior, se desarrolló un método analítico turbidimétrico que permitiera cuantificar clorhidrato de oxitetraciclina tanto materia prima como forma farmacéutica sólida de uso veterinario. El método desarrollado fue validado para lo cual se realizaron numerosas determinaciones cuantitativas del antibiótico cuyos resultados fueron analizados mediante técnicas estadísticas adecuadas.

Considerando que todos los métodos microbiológicos existentes para la cuantificación de tetraciclinas son inespecíficos en la determinación de éstas cuando están presentes sus productos de degradación, se hizo el estudio del comportamiento del método analítico turbidimétrico en la determinación del clorhidrato de oxite-traciclina cuando además de éste, se encuentran presentes posibles productos originados en la descomposición de la molécula.

II. GENERALIDADES.

II.1 FARMACO.

Los antibióticos son metabolitos microbianos obtenidos en forma natural o semisintética a partir generalmente de cultivos de hongos. Son compuestos que inhiben o retardan el crecimiento de una población microbiana sea bacteriana o fúngal. Se clasifican en diferentes grupos de acuerdo a su estructura química; a uno de éstos pertenece el clorhidrato de oxitetraciclina, sobre el cual se hace una revisión de sus propiedades físicas, químicas, farmacológicas y toxicológicas para, en base a éstas, desarrollar un método analítico microbiológico que permita su cuantificación en un producto veterinario.

II.1.A HISTORIA.

En 1929, a partir del descubrimiento de la penicilina, se inició la búsqueda de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana; en 1948 (2) se encontró un nuevo antibiótico: la clortetraciclina, la cual pertenece a una nueva familia de antibióticos: las tetraciclinas. En 1950 se conoció la oxitetraciclina (Figura 1) que fue aislada del actinomiceto Streptomyces rimosus por Finlay y colaboradores (3), y en ese mismo año Sobin y col. de la compañía Pfizer obtuvieron la patente correspondiente al proceso de su producción (3). El clorhidrato de oxitetraciclina (Figura 2) se empezó a utilizar en la terapéutica como una alternativa para incrementar la solubilidad de la oxitetraciclina en disolventes acuosos y

poder formular soluciones para administración parenteral.

En este trabajo se hace la revisión de las propiedades del clorhidrato de oxitetraciclina (forma presente en el medicamento) y de la oxitetraciclina base porque, aún cuando las propiedades físicas, químicas, fisicoquímicas de ambos compuestos son diferentes, cuando la sal se encuentra en solución o bien, en el organismo humano o animal, ocurre una hidrólisis en la molécula liberándose oxitetraciclina base que es la responsable de la acción farmacológica antibiótica.

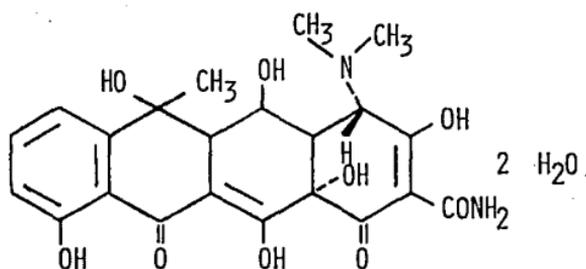


Figura No. 1. Fórmula desarrollada de Oxitetraciclina base.

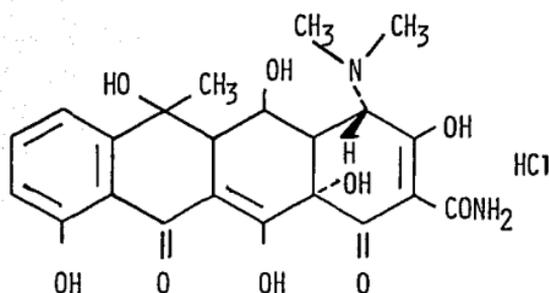


Figura No. 2. Fórmula desarrollada del clorhidrato de oxitetraciclina.

II.1.B PROPIEDADES.

II.1.B.a OXITETRACICLINA BASE.

NOMBRE QUIMICO.

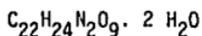
2-Naftacén carboxamida, 4-(dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-[4S-(4 α ,4 $\alpha\alpha$,5 α ,5 $\alpha\alpha$,6 β ,12 $\alpha\alpha$)] dihidrato.

SINONIMOS.

Terramicina (Pfizer), Abbocín, Berkmicén, Clinimicina, Glomícina, Hidroxitetraciclina, Oxaciclina, Oxalets, Oxidón, Oximicina, Oxipán, Oxitetraciclina, Oxitetracíd, Riomicina, Stevacín, Terra-

fungine, Terraject, Tetramel, Tetrán, Vandarcín y Vendracín (3).

FORMULA CONDENSADA:



FORMULA DESARROLLADA:

Figura No. 1.

PESO MOLECULAR:

496.47

DESCRIPCION:

Es un polvo cristalino, amarillo naranja, inodoro y con un sabor muy amargo. Es estable al aire pero se oscurece al ser expuesto a la luz.

SOLUBILIDAD:

Una parte de oxitetraciclina base es soluble en: (2) (3).

- 2000 partes de agua.
- 1 a 10 partes de HCl 3N.
- 1 a 10 partes de NaOH 1 N
- 100 partes de etanol
- 10 a 31 partes de propilenglicol.

Es prácticamente insoluble en éter y cloroformo.

ESPECTRO DE ABSORCION.

La oxitetraciclina base disuelta en una solución reguladora de fosfatos 0.1 M presenta 3 máximos de absorción (3) a 249 nm, 276 nm y 353 nm cuyos valores de $\log E_1^{1\%}$ son 2.38, 2.51 y 2.48, respectivamente.

Utilizando como disolvente una mezcla etanol.HCl presenta 2 máximos de absorción (4) a 267 nm y 357 nm, siendo sus respectivos valores de $\log \epsilon$ 4.32 y 4.10.

El espectro de absorción de una solución de oxitetraciclina base en una mezcla etanol-NaOH muestra 3 máximos de absorción (4) a 245 nm, 266 nm y 380 nm con valores de $\log \epsilon$ de 4.20, 4.14 y 4.16 respectivamente.

CONSTANTES DE ACIDEZ.

La oxitetraciclina base tiene 3 grupos ionizables, 2 grupos ácidos, cuyos valores de $-\log$ de la constante de acidez (pK_A) son $pK_{A_2}=3.5$, $pK_{A_1}=7.6$ y un grupo básico cuyo pK_A es 9.2 (4).

TEMPERATURA DE FUSION.

Se descompone sin fundir a 180°C (2).

ROTACION OPTICA.

Las soluciones de oxitetraciclina base poseen la propiedad de desviar el rayo de luz polarizada en diferentes disolventes dependiendo de éstos, el valor de rotación óptica (3) (4).

<u>disolventes</u>	rotación óptica específica $[\alpha]_{25}^D$
HCl 0.1 N	- 196.6
NaOH 0.1 N	- 2.1
Metanol	+ 26.5

ESPECTRO INFRARROJO

Espectro anexo.

II.1.B.b CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA.

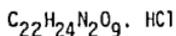
NOMBRE QUIMICO

2-Naftacencarboxamida 4-(dimetilamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a, octahidro 3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-[4S-(4 α , 4a α ,5 α ,5a α ,6 β ,12a α)]clorhidrato.

SINONIMOS.

Arcospectrón, Bio-micén, Geomicina, Gynamousse, Imperacfn, Macocfn, Macodfn, Oxricetfn, Oxlopar, Oxibiociclina, Oxibiotic, Oxiciclina, Oxiject, Stecsolfn y Tetratablín (3).

FORMULA CONDENSADA:



FORMULA DESARROLLADA:

Figura No. 2

ESPECTRO DE ABSORCIÓN INFRARROJO DE OTC



Nombre	OTC
Fecha	14/11/60
Lab.	
Anal.	
Int.	
Dir.	
Asesor	
Asistente	
Operario	
Revisor	
Director	

O M L E U L R

496.90

DESCRIPCION.

Es un polvo cristalino amarillo, higroscópico, con sabor amargo. Un gramo de oxitetraciclina base equivale a 1.08 gramos de clorhidrato de oxitetraciclina (1)(5).

SOLUBILIDAD.

Una parte de clorhidrato de oxitetraciclina es soluble en: (2)(3).

- 1 parte de agua
- 45 partes de metanol
- 45 partes de etanol
- 10 a 30 partes de propilenglicol

Es prácticamente insoluble en éter y cloroformo.

ESPECTRO DE ABSORCION.

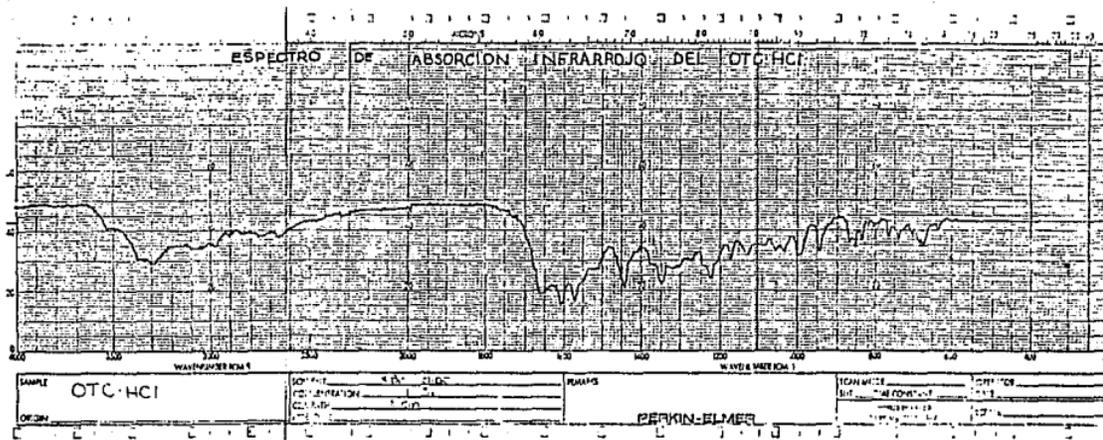
Las soluciones de clorhidrato de oxitetraciclina en HCl 0.1 N presentan un máximo de absorción a 353 nm (3).

pH

Una solución acuosa al 1% de clorhidrato de oxitetraciclina tiene un pH aproximadamente de 2.5 (1).

CONSTANTES DE ACIDEZ

Los valores de $-\log$ de las constantes de acidez del clorhi-



drato de oxitetraciclina en solución acuosa son 3.49, 7.55 y 9.24 respectivamente (4).

ROTACION OPTICA

Las soluciones de clorhidrato de oxitetraciclina en HCl 0.1 N desvían el haz de luz polarizada, su valor de rotación óptica específica a 25°C es $[\alpha]_D^{25} - 196.6^\circ$ (3).

TEMPERATURA DE FUSION

Se descompone sin fundir a temperaturas mayores a 180°C.

ESPECTRO INFRARROJO

Espectro anexo.

II.1.C ESTABILIDAD.

La oxitetraciclina base y su clorhidrato son estables durante dos años a temperatura ambiente protegidos de la humedad; sin embargo son muy sensibles a degradarse cuando se exponen directamente a la luz, cuando se somete a temperaturas altas, o bien en solución. Cuando la sal se disuelve en agua, la solución resultante tiende a enturbiarse debido a una hidrólisis en el clorhidrato en que se libera oxitetraciclina base. Su almacenamiento durante largos períodos a temperatura ambiente o superiores provoca que la oxitetraciclina base o su clorhidrato se degraden.

Entre los productos de degradación conocidos existen 2, que se sabe (2) poseen actividad tóxica (toxicidad); la anhidrooxitetraciclina y la epianhidrooxitetraciclina (esquema 2).

Todas las tetraciclinas poseen una gran capacidad de formación de complejos estables con cationes metálicos divalentes y trivalentes (2). Esta formación de complejos conduce a una pérdida de actividad biológica; lo cual se presenta cuando se administra por vía oral debido a que el complejo formado en el tracto gastrointestinal no es absorbible. También se forman complejos estables con compuestos como fenoles, ácidos benzoicos, urea, ácidos nucleicos, vitamina B₁₂, etc. (8).

Se han reportado incompatibilidades químicas entre la oxitetraciclina y varios compuestos. Dicha incompatibilidad se manifiesta en una pérdida de propiedades químicas, biológicas y farmacológicas. Algunos de los compuestos incompatibles son: cloruro de sodio, gluconato de calcio, hidroxizina, tartrato de metaraminol, succinato sódico de metilprednisolona, proclorperazina, tiopentona sódica, etc. (5).

II.1.D VIAS DE DEGRADACION.

Aún cuando no está establecida la ruta de degradación natural de la oxitetraciclina, se conocen algunos de los productos de su degradación los cuales se producen dependiendo de las condiciones a que se somete la molécula.

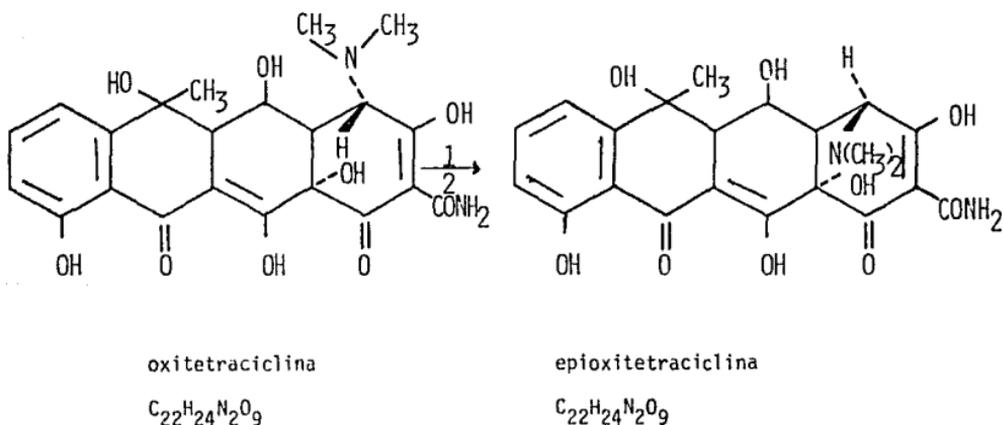
II.1.D.a DEGRADACION CON FORMACION DE EPIMEROS.

La oxitetraciclina como todas las tetraciclinas son susceptibles a reacciones de epimerización en el carbono 4 (Figura 1)

originando una nueva serie de compuestos, las 4-epitetraciclinas llamadas también cuatrimicinas. La reacción de epimerización se lleva a cabo en una variedad de sistemas de disolventes en un intervalo de pH entre 2 y 6, la velocidad de reacción se incrementa en presencia de ciertos aniones tales como fosfato, citrato y acetato (6). También se ve afectada por cationes polivalentes y urea (7).

Mc Cormick y col (6) reportan un método de epimerización de oxitetraciclina utilizando como disolvente una mezcla de: tetrahydrofurano, dimetilformamida y fosfato monobásico de sodio 1 M pH = 5.3 a 25° C durante 20 horas, obteniendo un 38% de 4-epioxitetraciclina. En ácido acético glacial a 25°C durante 20 horas se obtiene un 27% del compuesto epímero.

La reacción de epimerización se muestra en el esquema No. 1.



Esquema No. 1. Esquema que muestra la degradación de oxitetraciclina con formación de epímeros.

Condiciones de reacción:

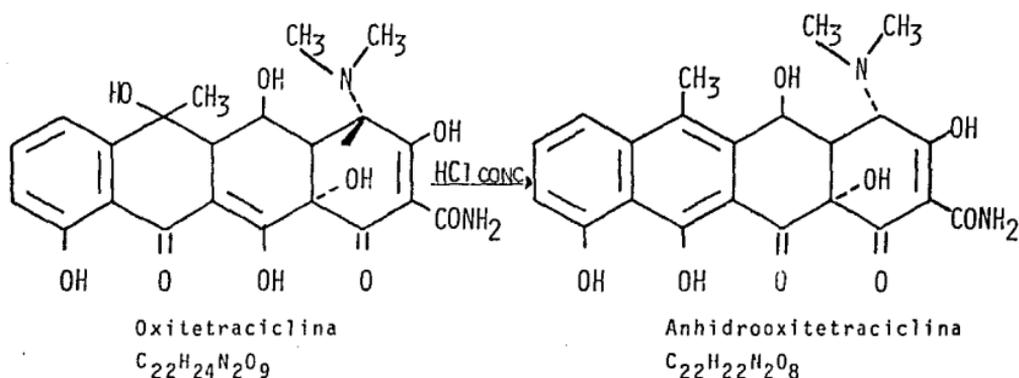
1. THF-DMFA- Na_2HPO_4 20 horas 25°C.
2. Acido acético glacial 20 horas 25°C.

Esquema No. 1. Esquema que muestra la degradación de oxitetraciclina con formación de epímeros.

En comparación con la oxitetraciclina, la epioxitetraciclina tiene (6) (Tabla No. 1) mayor absorbancia en la región del espectro UV entre 250 y 300 nm, mayor estabilidad en soluciones acuosas alcalinas y ácidas, menor poder rotatorio óptico, mayor solubilidad en agua, mayor tendencia a asociarse con fases acuosas en sistemas de separación por partición y menor actividad antimicrobiana "in vitro" contra Staphylococcus aureus.

II.1.D.b DEGRADACION EN MEDIO ACIDO.

La oxitetraciclina sometida a la acción química de ácidos fuertes se degrada de acuerdo al esquema No. 2.



Esquema No. 2. Serie de degradación de oxitetraciclina en medio ácido.

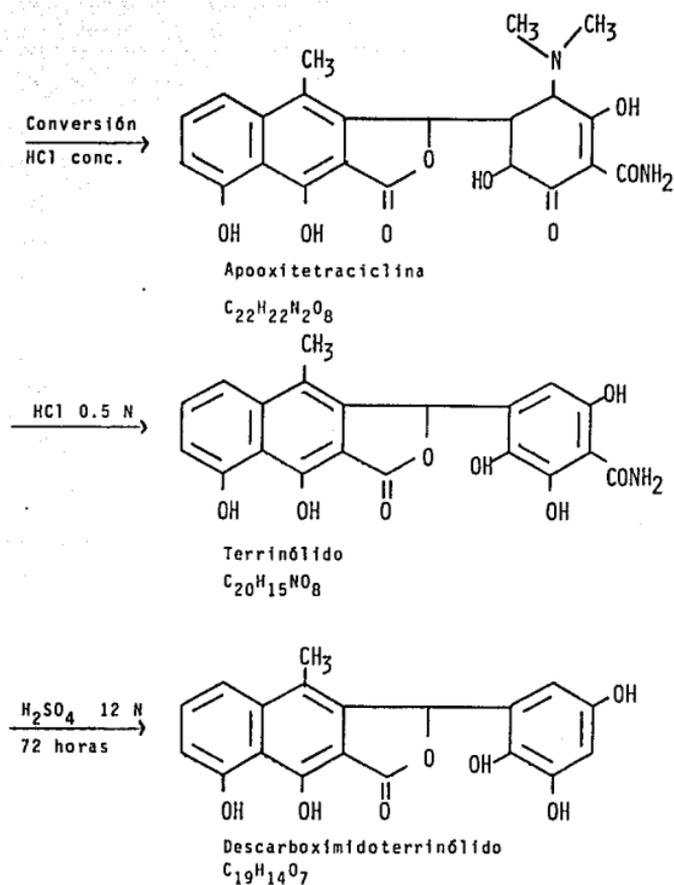
Tabla No. 1. Tabla de propiedades fisicoquímicas de oxitetraciclina y de sus productos de degradación.

COMPUESTO	FORMULA CONDENSADA	TEMP. DE DESCOMP. (°C)	ROTACION OPTICA		ESPECTRO DE ABSORCION		
			$[\alpha]_D^{25}$	DISOLVENTE	λ MAX (nm)	log ϵ	DISOLVENTE
Oxitetraciclina	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	180	- 196.6	HCl 0.1 N	249	* 2.38	Disol. regu- ladora de fosfatos Etanol.HCl Etanol.NaOH
			- 2.1	NaOH 0.1 N	276	* 2.51	
			+ 26.5	Metanol	353	* 2.48	
					267	4.32	
					357	4.10	
					245	4.20	
					266	4.14	
					380	4.16	
Clorhidrato de oxite- traciclina	$C_{22}H_{24}N_2O_9.HCl$	180	- 196	HCl 0.1 N	353	-	HCl 0.1 N
Epioxitetraciclina	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	163-164	- 253	HCl 3 N	215	4.09	H_2SO_4 0.1 N
					253	4.15	
					275	4.08	
					355	4.09	
Anhidrooxitetraciclina	$C_{22}H_{22}N_2O_8$	180-190	+ 52	Metanol.Dio- xano	271	4.56	Etanol.HCl
α -Apooxitetraciclina	$C_{22}H_{22}N_2O_8$	190-200	- 45	Dimetil for- mamida	425	3.80	Etanol.HCl
					377	3.87	
β -Apooxitetraciclina	$C_{22}H_{22}N_2O_8$	195-205	- 28	Etanol	249	4.78	Etanol.HCl
					375	4.00	

*Se refiere al log $E_{1cm}^{1\%}$

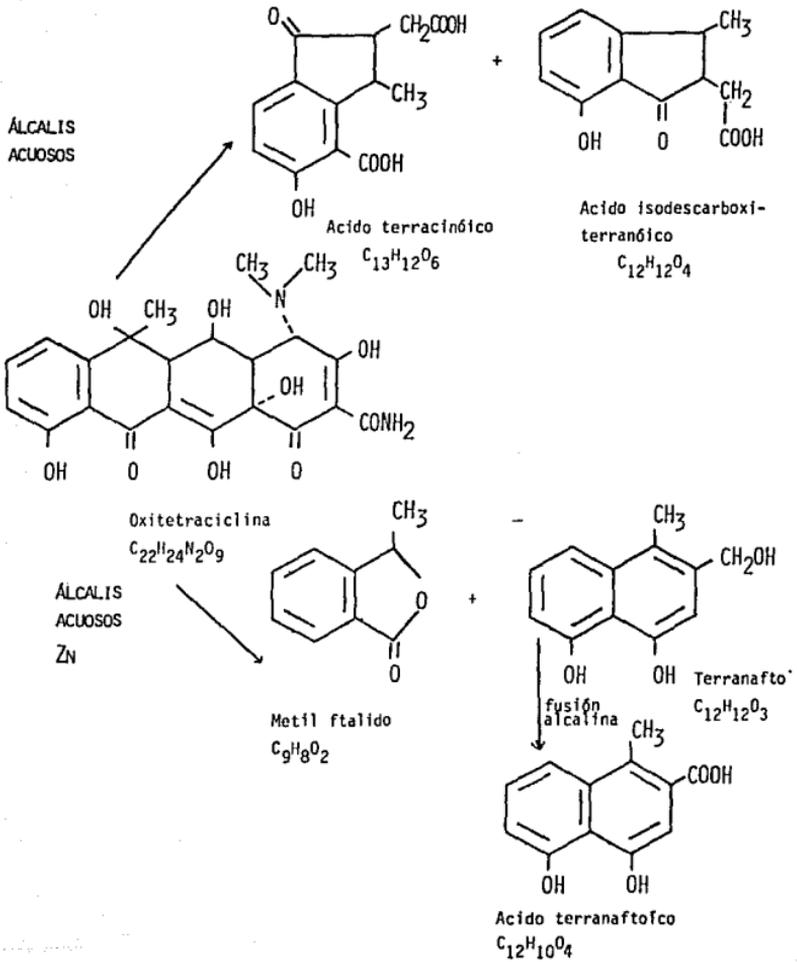
Tabla No. 1. Tabla de propiedades fisicoquímicas de oxitetraciclina y de sus productos de degradación.
(Continuación).

COMPUESTO	FORMULA CONDENSADA	TEMP. DE DESCOMP. (°C)	ROTACION OPTICA		ESPECTRO DE ABSORCION		
			$[\alpha]_D^{25}$	DISOLVENTE	λ MAX (nm)	log ϵ	DISOLVENTE
Terrinólido	$C_{12}H_{15}NO_8$	210-225	- 16	Metanol.HCl	249	4.75	Etanol.HCl
					360	4.08	
Descarboximidoterrinólido	$C_{19}H_{14}O_7$	215-250	----	-----	247	4.70	Etanol.HCl
					375	4.00	
Terranaftol	$C_{12}H_{12}O_3$	172-173	----	-----	232	4.79	Etanol
Acido terranaftóico	$C_{12}H_{10}O_4$	233-235	----	-----	236	4.60	Etanol.HCl
					310	3.76	
					343	3.71	
Acido isodescarboxiterracinóico	$C_{12}H_{12}O_4$	111-112	----	-----	225	4.04	Etanol.HCl
					319	3.56	
					237	4.34	Etanol.NaOH
					262	3.94	
Desdimetilamino oxitetraciclina	$C_{20}H_{19}NO_9$	216-217	- 137	Metanol	261	4.25	Etanol.HCl
					- 47	Acetona	
Desoxi desdimetilamino oxitetraciclina	$C_{20}H_{19}NO_8$	180-181	+ 112	Acetona	263	4.31	Etanol.HCl
					320	4.22	
Isodesoxi desdimetilamino oxitetraciclina	$C_{20}H_{17}NO_8$	210-220	- 32	Acetona	242	4.16	Etanol.HCl
					256	4.14	



Esquema No. 2. Serie de degradación de oxitetraciclina en medio ácido (Continuación).

De acuerdo a la serie de degradación en medio ácido, el primer compuesto formado es la anhidroxitetraciclina, una sustancia muy lábil que en condiciones ácidas se convierte muy fá-



Esquema No. 3. Serie de degradación de oxitetraciclina en medio básico.

ácido terracinoico (4) (Esquema No. 3).

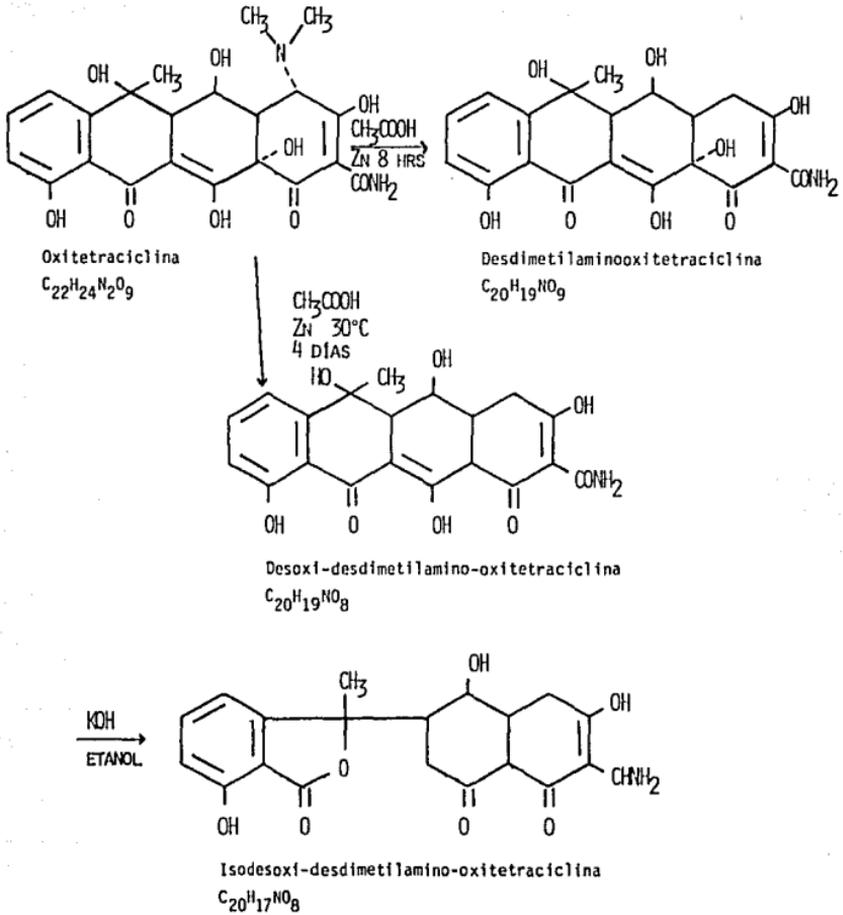
Cuando la oxitetraciclina se somete a la acción de los álcalis acuosos en presencia de zinc metálico se forman 2 compuestos: el metilftalido y el terranaftol (4). Sometiendo este último a fusión alcalina se obtiene el ácido terranaftóico (4).

Fundiendo directamente la oxitetraciclina con bases fuertes como NaOH o KOH se obtienen como productos de la reacción: ácido acético, ácido succínico, ácido salicílico, ácido m-hidroxibenzoico y ácido 6-acetil salicílico (4).

II.1.D.d DEGRADACION REDUCTIVA.

La oxitetraciclina puede ser objeto de reacciones de reducción con agentes adecuados, en que se logra eliminar el grupo dimetilamino y, dependiendo de las condiciones de la reacción, uno de los grupos hidroxilo.

Mezclando oxitetraciclina con polvo de zinc y ácido acético glacial a 30°C durante 8 horas, se obtiene un compuesto: el desdimetilamino-oxitetraciclina. Bajo las mismas condiciones pero durante 4 días, se obtiene el desoxi-desdimetilamino oxitetraciclina. Este compuesto en condiciones alcalinas da origen a otro: el isodesoxi-desdimetilamino-oxitetraciclina (4).



Esquema No. 4. Vía de degradación de oxitetraciclina cuando ésta se somete a la acción de agentes reductores.

II.1.E FARMACOLOGIA.

II.1.E.a INDICACIONES.

Las tetraciclinas son antibióticos muy empleados en la práctica médica, especialmente para casos de infecciones causadas por bacterias Gram positivas. Se ha visto que este tipo de bacterias son más susceptibles a la acción antibiótica de las tetraciclinas que las Gram negativas, pero su uso se ha restringido debido a que presenta problemas de resistencia de los microorganismos al fármaco y a la existencia de agentes antimicrobianos más eficaces.

Particularmente la oxitetraciclina es muy utilizada para tratar infecciones causadas por Staphylococcus aureus. También se han reportado casos de uso en leptospirosis, acné, toxoplasmosis, tracoma, infecciones del tracto urinario y vaginitis causada por Gardnella vaginalis. Así mismo se usa para tratar pacientes, como antibiótico de elección, que son hipersensibles a la penicilina (5).

La oxitetraciclina se prescribe para administración oral y parenteral, debiendo evitarse la administración tópica excepto para uso oftálmico ya que existe un alto riesgo de hipersensibilización al fármaco (10).

La dosis recomendada (10) es:

ORAL ADULTOS: 200 a 500 mg cada 6 horas, ORAL INFANTIL (niños mayores de 8 años) de 6.25 a 12.5 mg por Kg de peso corporal, cada 6 horas. Por vía INTRAMUSCULAR ADULTOS 100 mg cada 8 horas, 150 mg cada 12 horas o hasta 250 mg una vez al día, INTRAMUSCULAR INFANTIL

(para niños mayores de 8 años) de 5 a 8.3 mg por Kg de peso cada 8 horas; o bien 7.5 a 12.5 mg por Kg de peso cada 12 horas. La dosis diaria máxima no debe exceder 250 mg.

El uso de oxitetraciclina o de clorhidrato de oxitetraciclina en la práctica médica acarrea ventajas y desventajas con respecto al uso de otras tetraciclinas. El factor más importante es la susceptibilidad o sensibilidad del agente infeccioso a la acción de la oxitetraciclina. Como se mencionó anteriormente, existen casos como infecciones oftálmicas causadas por Staphylococcus aureus, infecciones vaginales causadas por G. vaginalis en que particularmente se recomienda el uso de oxitetraciclina (5).

La oxitetraciclina puede administrarse por vía oral o parenteral, la elección depende de varios factores inherentes a la vía de administración tales como tiempo de acción, naturaleza de la infección, etc. La intención de usar la sal es con el fin de incrementar la solubilidad en agua principalmente cuando se requiere de soluciones acuosas inyectables.

II.1.E.b MECANISMO DE ACCION.

Los antibióticos pertenecientes a la familia de las tetraciclinas son agentes cuya acción bacteriostática puede ser explicada en función de una interferencia en la biosíntesis de proteínas en los ribosomas bacterianos, por lo que para poder ejercer su acción, es necesario penetrar a la célula y para esto se han propuesto 2 mecanismos (9).

El antibiótico atraviesa primero la pared celular mediante un transporte pasivo, es decir sin gasto de energía, y después la membrana celular por medio de un transportador requiriendo de un gasto de energía y por consiguiente de un transporte activo. Una vez dentro, el antibiótico se sitúa en el ribosoma e impide la unión del RNAt (RNA de transferencia) ligado al aminoácido (amino-acil-RNAt) al sitio aceptor del complejo RNAm (RNA mensajero) ribosoma, conduciendo a una inhibición en la capacidad bacteriana de biosintetizar sus propias proteínas, evitando la reproducción celular.

II.1.E.c FARMACOCINETICA.

La ABSORCION tanto de la oxitetraciclina como de su clorhidrato cuando se administran por vía oral ocurre en el tracto gastrointestinal, principalmente en el estómago y duodeno. Esta absorción aún cuando es adecuada porque permite alcanzar niveles plasmáticos terapéuticos, es incompleta (9), se absorbe un 58% (10), recomendándose que cuando se administren tetraciclinas por vía oral se ingieran con agua suficiente para evitar ulceración en el esófago y disminuir la irritación gastrointestinal. Además estos fármacos preferentemente deben administrarse cuando el estómago esté vacío (1 hora antes o 2 después de los alimentos) para obtener concentraciones plasmáticas óptimas (10).

El volumen de DISTRIBUCION de los fármacos es de 0.9 a 1.9 litros por Kg de peso, difunde libremente hacia la mayoría de los tejidos, fluidos y cavidades, tendiendo a localizarse en huesos,

hígado, bazo, tumores y dientes. Atraviesan la barrera placentaria y entre 20 y 40% se une a proteínas (10).

El TIEMPO DE VIDA MEDIA es de 6 a 10 horas en el caso de pacientes normales y de 47 a 66 horas en el caso de pacientes anúricos (10).

La EXCRECIÓN ocurre por vía renal mediante filtración glomerular. Se informa que también se excreta por vía fecal y en el caso de madres lactantes, en leche materna (10).

II.1.E.d INTERACCIONES CON OTROS FARMACOS.

Existe información bibliográfica (10) que afirma que la oxitetraciclina interacciona "in vivo" con otros fármacos, algunos de éstos son:

1. Fármacos conteniendo iones metálicos, tales como aminosalicilato de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio, salicilato de colina, salicilato de magnesio, fármacos con hierro, etc. La administración simultánea de este tipo de fármacos y de oxitetraciclina, conduce a la formación de complejos no absorbibles en el tracto gastrointestinal, por lo que el efecto farmacológico no se presenta puesto que el fármaco está ausente en la sangre.
2. Fármacos antiácidos. Los fármacos antiácidos, hidróxidos de aluminio y magnesio principalmente, además de formar complejos no absorbibles ocasionan un aumento del pH gástrico provocando así, una disminución en la velocidad y cantidad de fármaco absorbido.

3. Metoxifluorano. El uso concurrente de éste y oxitetraciclina incrementa el potencial de nefrotoxicidad de esta última.
4. Penicilinas. Cuando se administran penicilinas concomitantemente con antibióticos de efecto bacteriostático, como es el caso de tetraciclinas, ocurre una interacción entre ambos provocando una interferencia en el efecto bactericida de las penicilinas por lo que se recomienda evitar la administración simultánea de estos tipos de antibióticos.
5. Bicarbonato de sodio. Este compuesto al igual que los fármacos antiácidos, provocan un aumento del pH gastrointestinal con la consecuente disminución de la absorción oxitetraciclina.

II.1.F TOXICIDAD.

En la sección correspondiente a estabilidad se mencionó que existen 2 productos de degradación de oxitetraciclina con actividad tóxica potencial, la Anhidrooxitetraciclina y la Epianhidrooxitetraciclina. Estos compuestos producen efectos tóxicos con sintomatología similar a la que se presenta en el síndrome de Fanconi: glicosuria, aminoaciduria, acidosis, náuseas, etc y se presenta cuando se ingiere oxitetraciclina ya degradada (2).

Para evitar complicaciones tóxicas en el uso de medicamentos conteniendo oxitetraciclina deben considerarse las siguientes precauciones (10):

1. Sensibilidad cruzada. Pacientes hipersensibles a alguna de las tetraciclinas pueden presentar hipersensibilidad a otros miem-

bros de las tetraciclinas.

2. Embarazo. Las tetraciclinas atraviesan la placenta, por lo que su uso no se recomienda durante la última mitad del embarazo. Durante la etapa de gestación las tetraciclinas tienden a depositarse en huesos, provocando una inhibición en el crecimiento esquelético del feto.
3. Madres lactantes. Las tetraciclinas se excretan en leche materna y aunque forman complejos con calcio, no se recomienda su uso durante la etapa de lactancia debido a la posibilidad de causar decoloración permanente en los dientes, inhibición del crecimiento esquelético en niños, reacciones de fotosensibilidad y úlcera bucal.
4. Pediatría. En niños menores de 8 años las tetraciclinas pueden causar los mismos problemas mencionados en el punto anterior, por lo que su uso en niños, se recomienda solo cuando no se pueden utilizar otros antibióticos.

II.1.G METODOS ANALITICOS.

Para la determinación de oxitetraciclina y de clorhidrato de oxitetraciclina en productos farmacéuticos se han desarrollado numerosos métodos analíticos que permiten una cuantificación adecuada del fármaco. Algunos son microbiológicos en los que utilizan microorganismos susceptibles a dicho antibiótico.

Existen otros métodos de análisis que involucran reacciones químicas de valoración en todas sus variantes: ácido-base,

redox, de formación de complejos, de precipitación, etc. Otros se fundamentan en la determinación directa de algunas características moleculares por medio de instrumentos, por ejemplo espectrofotometría ultravioleta, espectroscopía infrarroja, etc. Existen también métodos que se fundamentan en métodos fisicoquímicos de separación por ejemplo cromatografía en sus distintos tipos, y algunos más combinan la detección instrumental con reacciones químicas y/o métodos cromatográficos, por ejemplo espectrofotometría visible, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos de alta resolución, etc.

En comparación con los métodos microbiológicos, los métodos basados en la medición de propiedades moleculares químicas y fisicoquímicas tienen la ventaja de ser más sencillos siempre que se cuenten con las condiciones y equipo necesario, son más rápidos, requieren de menor cuidado del analista, pero son menos sensibles y sin modificaciones especiales, son inespecíficos; ésto como resultado de que las propiedades a medir, pueden ser enmascaradas por la presencia de excipientes y/o productos de degradación.

II.1.G.a METODOS ESPECTROFOTOMETRICOS.

Los métodos espectrofotométricos para la determinación de oxitetraciclina y su clorhidrato se fundamentan en la medición de la absorción de luz ultravioleta por la molécula misma, o de luz visible en complejos coloridos formados por el antibiótico y algún otro reactivo.

Directamente es posible determinar oxitetraciclina o su clorhidrato en soluciones de etanol.HCl, etanol.NaOH o en solución reguladora de fosfatos 0.1 M, pH = 4.5 considerando los mínimos de absorción de sus espectros correspondientes.

Hughes y Wilson (7) reportan la determinación espectrofotométrica a 490 nm de un complejo color naranja-café, formado entre la oxitetraciclina y el cloruro férrico, al igual que la determinación de un complejo formado por la oxitetraciclina y soluciones de cerio. Aún cuando los autores no informan acerca de la interferencia de productos de degradación, Bailey (13) informa que es un método no específico y que impurezas estructuralmente similares interfieren en la determinación.

Los métodos espectrofotométricos en general tienen la ventaja de ser rápidos y sencillos, pero en el caso particular de oxitetraciclina tienen la desventaja de ser inespecíficos, es decir no detectan impurezas estructuralmente similares ni productos de degradación (7).

II.1.G.b METODOS FLUOROMETRICOS.

Todas las tetraciclinas tienen la propiedad de formar quelatos muy estables con cationes, especialmente los divalentes como magnesio, calcio, zinc y bario. Esta propiedad provoca que las tetraciclinas incrementen su fluorescencia inherente logrando así utilizar la fluorometría como una técnica de análisis de tetraciclinas, tanto cualitativo como cuantitativo.

Hughes y Wilson (7) informan acerca de un método de análisis fluorométrico cuantitativo de oxitetraciclina en que la determinación se hace después de una serie de extracciones sucesivas formando un complejo con cloruro de magnesio. La concentración de oxitetraciclina en la solución muestra es proporcional a la diferencia de fluorescencia entre el quelato Mg, oxitetraciclina y el compuesto libre $MgCl_2$ liberado por la adición de EDTA a la solución.

En el caso particular de la determinación de oxitetraciclina los métodos fluorométricos tienen la desventaja de ser inespecíficos; por eso se han diseñado métodos analíticos que combinan algún método de separación, por ejemplo cromatografía en capa fina, con el análisis fluorométrico.

II.1.G.c METODOS CROMATOGRAFICOS.

Ragazzi y Veronese (14) emplean la combinación de métodos descrita en el punto anterior para separar y cuantificar oxitetraciclina, tetraciclina y algunos productos de degradación de ésta y consiste en disolver la muestra en metanol; se utilizan placas para cromatografía cubiertas con celulosa microcristalina, como eluentes se emplean soluciones acuosas de sales de: cloruro de calcio, cloruro de bario, cloruro de aluminio y cloruro de zinc. Después de eluir las placas se determina la fluorescencia de cada uno de los complejos formados una vez separados. Este método separa oxitetraciclina, tetraciclina y anhidroxitetraciclina pero tie-

ne la desventaja de que la separación de epímeros no es adecuada.

Alvarez y Col. (15) describen un método de separación y cuantificación de tetraciclina y de sus productos de degradación por cromatografía en capa fina utilizando gel de sílice tipo Kieselguhr impregnada con soluciones acuosas de EDTA ajustadas a 2 diferentes valores de pH. Se utilizan dos sistemas de eluentes dependiendo del pH de la solución de EDTA; cuando el pH de la solución es 7.5, el eluyente es una mezcla agua-acetona (1:10). Después se hace la determinación espectrofotométrica a 430 nm. Este método tiene ventajas tales como: permite detectar tetraciclinas sin degradar hasta un 0.5% y hasta 0.1% de los productos de degradación en presencia de las moléculas sin degradar. El método tiene el inconveniente de que previo al análisis el gel de sílice requiere de varios lavados con HCl para dejarlo libre de calcio y hierro. Este proceso es tedioso y requiere de experiencia considerable por parte del analista para obtener el soporte libre de iones, con algunos lotes quizá mal lavados, es muy posible obtener separaciones no muy bien definidas o muy coleadas.

Gyanchandani y Col. (16) separan e identifican oxitetraciclina en presencia de otras tetraciclinas y algunos productos de degradación de la tetraciclina mediante cromatografía en capa fina.

Este método emplea gel de sílice tipo Kieselguhr suspendido en solución acuosa 0.1 M de EDTA y polietilenglicol 400 al 20% en glicerina y como disolventes, metiletilcetona saturada con solución reguladora de Mc Ilvaine pH = 4.7, o bien una mez-

cla de diclorometano - formiato de etilo-etanol (9:9:2). Este método tiene la ventaja de que el gel de sílice no requiere previo tratamiento aunado a que la preparación de las placas con polietilenglicol 400 en glicerina les proporciona un contenido de humedad tal, que una vez preparadas las placas pueden guardarse hasta 4 semanas antes de usarse. Este método no informa acerca de la separación de los productos de degradación de la oxitetraciclina.

Szabó y Col. (17) describen un método cromatográfico en capa fina para la separación y cuantificación de oxitetraciclina, uno de los isómeros de la apooxitetraciclina y otras tetraciclinas, empleando placas para cromatografía previamente tratadas con una solución metanólica de etilenglicol al 20%. Las placas se recubren con celulosa microcristalina suspendida en una mezcla de solución acuosa de ácido cítrico 0.1 M y fosfato dibásico de sodio 0.2 M eluyéndolas con acetato de etilo saturado con agua. Los cromatogramas se revelan con una mezcla (1:1) de cloruro de magnesio 0.2 M en agua-etanol al 95% y después de 5 minutos con tri-etanol amina al 10% v/v en metanol. Este método es muy rápido y muy sencillo, permite separar oxitetraciclina y uno de sus productos de degradación, pero no proporciona información acerca de la separación de los otros productos de degradación.

Por medio de cromatografía en gel, Ragazzi y Veronese (18) reportan la separación de: oxitetraciclina, tetraciclina, epitetraciclina, anhidrotetraciclina, epianhidrotetraciclina y otras tetraciclinas empleando columnas de geles de dextrán Sephadex y

de poliacrilamida Biogel P. La columna se eluye con ácido acético 0.1 M, las fracciones se recolectan y se determina su absorción respectiva por espectrofotometría UV. Este método separa oxitetra-ciclina, tetraciclina, y algunos productos de degradación de ésta, pero tiene la desventaja que los materiales soporte son muy caros además que requiere experiencia del analista debido a que el método no es sencillo de realizar.

Sina y Col. (19) describen un método de separación de oxitetra-ciclina y sus productos de degradación: anhidrooxitetra-ciclina, apooxitetra-ciclina y terrinólidos. El método consiste en cromato-gra-fía en papel, en que éste se impregna previamente con solución reguladora de Mc Ilvaine pH = 5 conteniendo 10% de urea. El cro-matograma se eluye con una mezcla (1:1:1) de piridina, acetato de etilo y cloroformo, saturado con urea y se revela observando el papel con luz UV después de exponerlo a vapores de amoníaco de 5 a 15 segundos. El método tiene la ventaja que separa la oxitetra-ciclina y algunos de sus productos de degradación, pero así mismo tiene la desventaja de que no separa epímeros.

Bailey (13) describe un método de separación de oxitetra-ciclina de todos sus productos de degradación mediante cromatogra-fía de líquidos de partición en columna, seguida de una determina-ción cuantitativa espectrofotométrica. La fase estacionaria utili-zada es una solución reguladora de fosfato de potasio pH = 3.3 uni-da a celita 545 tratada con ácido, y la fase móvil es una mezcla (67.5-32.5) de acetato de etilo:n-hexano. Se reúne el volumen

eluido entre 150 y 250 ml. La epioxitetraciclina y demás impurezas eluyen después de 500 ml. Aún cuando el autor informa que no hay interferencia en el análisis, existen informes (20) de que muy posiblemente se formen productos de degradación durante la elución de la columna. Este método al igual que el reportado por Alvarez (15) tiene la desventaja que el soporte la celita, debe tratarse con HCl para eliminar los iones, con los posibles errores ya mencionados.

Se han reportado diversos métodos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para la separación y cuantificación simultánea de oxitetraciclina, de sus productos de degradación y algunas impurezas.

Mack y Ashworth (21) describen un método por CLAR para separar y cuantificar oxitetraciclina, tetraciclina, algunos de los productos de degradación de ésta y otras tetraciclinas empleando una columna de octadecilsilano y como fase móvil una mezcla de isopropanol, dietanolamina, solución de ácido fosfórico al 85% y EDTA tetraamónico. El método tiene la ventaja de permitir un análisis rápido pero con la desventaja que uno de los componentes, el EDTA tetraamónico no es disponible comercialmente, por lo que es necesario prepararlo en el laboratorio con los problemas que ésto acarrea. El método no informa acerca de la separación y cuantificación de los productos de degradación de la oxitetraciclina.

Mourot y Col. (22) desarrollan un método cromatográfico de líquidos de par iónico en fase reversa para la separación y cuantifi-

cación de oxitetraciclina de cada uno de sus productos de descomposición, utilizando una columna Lichrosorb RP-8, como fase móvil un gradiente lineal que va de (92:8) de solución acuosa de hidrógeno sulfato de tetrabutilamonio pH = 2.6, acetonitrilo, hasta alcanzar finalmente una proporción de (80:20). La muestra se disuelve en dimetilformamida y la detección se hace a 275 nm. Este método permite la separación y determinación de oxitetraciclina y de todos y cada uno de sus productos de degradación, pero tiene la desventaja que el pH ácido de la fase móvil disminuye considerablemente la eficiencia y el tiempo de vida útil de la columna.

Athanikar y Col. (23) describen un método por CLAR de separación y cuantificación de oxitetraciclinas y otras tetraciclinas empleando una columna C_{18} y una mezcla (75:25) de solución reguladora de fosfatos pH = 6.7, 0.2 M, acetonitrilo como fase móvil. Este método es muy sencillo pero la alta concentración de sales en la fase móvil puede causar problemas de obstrucción en las bombas del aparato que impulsa la fase móvil a través de la columna.

La cromatografía de gases es una técnica analítica muy útil. Para analizar por esta técnica un compuesto, éste debe ser volátil y estable a altas temperaturas. Considerando lo anterior y las propiedades fisicoquímicas de la oxitetraciclina no es posible desarrollar métodos analíticos por cromatografía de gases, por lo que es necesario preparar derivados del antibiótico que sean volátiles y termoestables.

Marshall y Thomas (7) describen un método de separación y

cuantificación de tetraciclinas por cromatografía de gases en que previo al análisis se forman trimetilsilil derivados. Encontraron que la separación en columnas SE-30 estuvo restringido a solo ciertas tetraciclinas y no fue posible encontrar las condiciones adecuadas para el análisis de tetraciclinas de uso común.

Tsuji y Roberston (24) desarrollan un método por cromatografía de gases para el análisis de trimetilsilil derivados de oxitetraclinas y otras tetraciclinas. Los autores mencionan que las condiciones de las reacciones de derivación, provocan que las muestras se degraden parcialmente.

II.1.G.d VOLUMETRIA.

Yokohama y Chaten (7) describen un método analítico para la valoración ácido-base no acuosa de tetraciclinas. La muestra se disuelve en una mezcla de nitrometano, ácido fórmico y benceno y se valora con una solución de ácido perclórico en dioxano, utilizando como indicador del punto de equivalencia una mezcla de azul de metileno y rojo quinaldine. Esta reacción es inespecífica en la determinación de oxitetraclina, es decir no diferencia otras tetraciclinas, productos de degradación o impurezas estructuralmente similares.

II.1.G.e POLARIMETRIA.

Existe poca información sobre métodos de análisis de oxitetraclina basándose en sus propiedades de rotación óptica. Mitscher

y Col. (7) informan que los métodos polarimétricos tienen gran sensibilidad y que pueden emplearse como técnicas analíticas para la determinación de tetraciclinas y sus productos de degradación, en combinación con alguna técnica de separación.

II.2 METODO MICROBIOLOGICO.

II.2.A INTRODUCCION.

Entre los métodos analíticos de uso común, están los microbiológicos que son muy utilizados hoy en día para el análisis cuantitativo de antibióticos y vitaminas presentes en muestras biológicas, productos farmacéuticos, etc.

Los métodos microbiológicos conocidos son:

- a) Cilindro placa o difusión en agar, y
- b) turbidimétricos.

El primero se fundamenta en la medida de la inhibición causada por un antibiótico sobre el crecimiento de un microorganismo sensible al antibiótico cuando se mantiene en un medio de cultivo y bajo condiciones adecuadas. Los turbidimétricos se fundamentan en la medición de la turbidez producida por las células microbianas en suspensión después de la interacción con el antibiótico a analizar.

Los métodos turbidimétricos en comparación con los métodos cilindro placa, son más sensibles y más exactos (26), pero son más laboriosos, requieren de mayor tiempo de análisis y mayor atención del analista. Para el análisis de clorhidrato de oxitetraciclina o

de oxitetraciclina base existen métodos de ambos tipos, el de cilindro placa utiliza como microorganismo de prueba Bacillus cereus (variante mycoides) ATCC 11778 (11) o Bacillus pumilus NCTC 8241 (12), y los turbidimétricos utilizan Staphylococcus aureus ATCC 6538-P (1). Aún cuando existen ambos métodos se sabe que el análisis de oxitetraciclina y de tetraciclinas en general, el método turbidimétrico es más sensible y se obtienen resultados más exactos y precisos. El método empleado en el presente trabajo es un método turbidimétrico.

II.2.B FUNDAMENTO Y DESCRIPCION.

II.2.B.a FUNDAMENTO.

El análisis microbiológico de un antibiótico se fundamenta en los siguientes puntos (25):

1. Una comparación cuantitativa del efecto inhibitor que ejerce una muestra problema del antibiótico y un estándar de referencia del mismo, sobre un microorganismo susceptible al antibiótico, cuando se cultiva en un medio y condiciones adecuadas para su crecimiento.
2. La medida del efecto inhibitor del antibiótico sobre la multiplicación y crecimiento del microorganismo de prueba, y
3. la existencia de algún tipo de relación cuantitativa entre la respuesta observada y la concentración de antibiótico utilizada tanto para la muestra problema como para el estándar.

Independientemente del mecanismo de acción específico de cada familia de antibióticos, el efecto inhibitor de un antibiótico sobre un microorganismo susceptible, puede explicarse en función de

4 mecanismos:

- a) un aumento del tiempo de degradación del microorganismo.
- b) aumento de la fase lag.
- c) disminución de una fracción del número de células presentes.
- d) la combinación de algunas de las anteriores.

II.2.B.b DESCRIPCION.

El método llamado 5 + 1, consiste en la medición y comparación del efecto inhibitor que ejerce una solución diluída problema de concentración desconocida de antibiótico, con respecto al ejercido por una serie de 5 soluciones diluídas de antibiótico estándar con concentraciones conocidas y diferentes dispuestas progresivamente en un intervalo (curva estándar) sobre el crecimiento de un microorganismo susceptible, suspendido en un medio de cultivo en cantidades conocidas, después de un período de incubación a una temperatura y durante un período determinado. La determinación del número de células microbianas presentes en el medio de cultivo después de la interacción antibiótico-microorganismo, se logra midiendo la turbidez del medio (porcentaje de transmitancia) producida por las células suspendidas en él, con respecto a la turbidez que tiene una muestra que contiene solo diluyente y medio de cultivo sin haber sido inoculado (tubo blanco).

La concentración desconocida de antibiótico presente en la solución problema se determina interpolando el valor de % de transmitancia promedio correspondiente, en una relación matemática res-

puesta-dosis que se obtiene entre los valores promedio del % de transmitancia (respuesta) de cada una de las soluciones correspondientes a la curva estándar y sus respectivas concentraciones (dosis). Conociendo la concentración de antibiótico en la solución problema, es posible, considerando sus factores de dilución, conocer la cantidad de antibiótico presente en la muestra analizada.

II.2.C ESTUDIO DE VARIABLES.

Los métodos microbiológicos son muy sensibles y se ven influenciados de manera importante por numerosos factores (25)(26) mismos que deben ser considerados siempre que se esté trabajando con este tipo de métodos. Estos factores pueden ser clasificados en los que modifican la acción biológica del antibiótico, y los que influyen en el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo durante el análisis. Entre los primeros están:

- a) Intervalo de concentraciones de las soluciones estándar.
- b) Presencia de sustancias inhibitoras.
- c) La solubilidad en el disolvente.
- d) La estabilidad del antibiótico en el disolvente durante el análisis.

Los que afectan el crecimiento del microorganismo son:

- a) La concentración de la suspensión microbiana en el medio.
- b) La fase de crecimiento del microorganismo.
- c) La temperatura de incubación.
- d) La duración del periodo de incubación.

La bibliografía disponible no informa acerca del mecanismo por el cual influye, ni los métodos para evaluar dicha influencia.

II.2.C.a INTERVALO DE CONCENTRACIONES DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR.

Para estudiar y desarrollar métodos microbiológicos turbidimétricos de análisis del tipo 5 + 1, una de las primeras etapas consiste en la determinación de las concentraciones de las soluciones de antibiótico tanto estándar como problema, de manera que permitan una cuantificación adecuada del mismo, para lo cual debe considerarse lo siguiente:

Los resultados obtenidos después de la interacción antibiótico-microorganismo pueden expresarse cuantitativamente relacionando matemática y gráficamente la concentración (dosis) del antibiótico y el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo (turbidez, % de transmitancia), es decir, mediante una relación dosis respuesta. Una gráfica de esta relación se muestra en la Figura No. 5 (25).

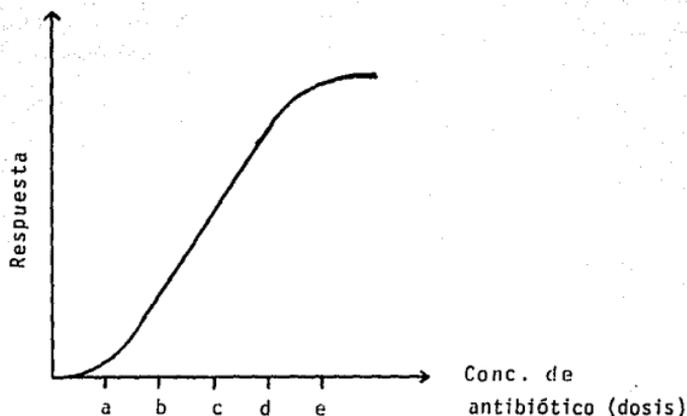


Figura No. 5. Relación dosis-respuesta obtenida en el análisis turbidimétrico de Estreptomycin utilizando K. pneumoniae como microorganismo de prueba.

El criterio de elección del intervalo de concentraciones más adecuado de antibiótico, se basa en la relación dosis respuesta obtenida para el antibiótico que permita obtener una relación lineal entre las variables, es decir el intervalo entre los puntos a y d, ya que así se expresa de mejor manera la dependencia cuantitativa de la respuesta con respecto a la dosis del antibiótico utilizado en el análisis. Para el análisis microbiológico de oxitetraciclina y de clorhidrato de oxitetraciclina, la USP (1) recomienda que la dosis media del intervalo de soluciones sea igual a

0.24 mcg/ml.

II.2.C.b PRESENCIA DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS.

Los antibióticos y vitaminas son moléculas con una gran susceptibilidad de que su estructura química se altere debido a la presencia de sustancias o partículas extrañas tales como cationes, aniones, metales pesados e impurezas en general. Particularmente la oxitetraciclina al igual que todas las tetraciclinas tienen la propiedad de formar complejos muy estables con los cationes, principalmente los divalentes y trivalentes conduciendo a una pérdida de actividad química, biológica y farmacológica (2) pudiendo provenir dichas impurezas del agua de lavado.

II.2.C.c ESTABILIDAD DEL ANTIBIOTICO.

Además de la presencia de las sustancias inhibidoras, es preciso considerar la estabilidad inherente a la molécula a lo largo de todo el análisis. Para ésto es necesario evitar factores tales como luz, temperatura y todas aquellas manipulaciones que puedan conducir a una alteración química de la molécula. Se recomienda proteger el material de la luz.

II.2.C.d SOLUBILIDAD DEL ANTIBIOTICO.

Las técnicas microbiológicas de análisis requieren de cantidades de antibiótico muy pequeñas para su análisis. Para alcanzar tales concentraciones es necesario hacer diluciones sucesivas de la

muestra utilizando un diluyente adecuado. La elección del disolvente debe considerar:

- a) La estabilidad del antibiótico en el diluyente a lo largo de todo el análisis.
- b) La ausencia de efecto alguno sobre el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo.
- c) La solubilidad del antibiótico en el disolvente y diluyente.

Considerando que la muestra va a ser diluida, la solubilidad del antibiótico juega un papel de suma importancia puesto que las alícuotas tomadas para las distintas diluciones deben ser representativas de la solución total. Esto se logra únicamente con soluciones totalmente homogéneas en las que la muestra debe estar totalmente disuelta.

II.2.C.e CONCENTRACION DE LA SUSPENSION MICROBIANA.

En un análisis microbiológico el crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo cuando interacciona con el antibiótico depende de muchos factores, entre éstos y muy relacionados entre sí están: la concentración de la suspensión microbiana, el tiempo de incubación, nutrientes, pH, etc.

Poblaciones microbianas con concentraciones bajas son muy fácilmente controladas por el antibiótico de manera que éste no permite un crecimiento adecuado; esto se refiere a que el número de células microbianas es aproximadamente el mismo en cada uno de los puntos de la curva estándar originando en la relación dosis respues-

ta una curva con pendiente tendiente a cero. Con poblaciones altamente concentradas la fracción de células microbianas destruidas no es apreciable debido al gran número de éstas aunado a que el tiempo de vida de la población se reduce notablemente debido a que los nutrientes en el medio se agotan rápidamente.

II.2.C.f FASE DE CRECIMIENTO.

La vida de una célula microbiana al igual que la de todos los seres está regida por cambios fisiológicos que permiten la descripción del ciclo vital de acuerdo a ciertas etapas. El desarrollo de un cultivo bacteriano en un medio apropiado puede explicarse también en función de etapas o fases (Figura No. 6) (27).

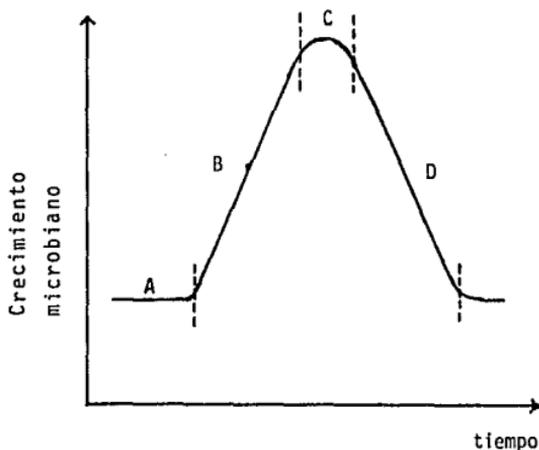


Figura No. 6. Curva típica de crecimiento que describe las etapas de desarrollo de una población microbiana. A) Fase lag o de retardo, B) Fase logarítmica o exponencial C) Fase estacionaria y D) Fase de declinación o muerte.

En el caso particular del análisis microbiológico turbidimétrico de oxitetraciclina en que se utiliza S. aureus como microorganismo de prueba, la influencia de la fase de crecimiento puede explicarse considerando que para que el antibiótico pueda ejercer su acción bacteriostática, es necesario que penetre a la célula bacteriana (mecanismo de acción). Para que ésto ocurra de manera óptima el microorganismo debe estar en fase logarítmica ya que a partir del momento en que la célula se encuentra en fase estacionaria, los nutrientes esenciales empiezan a agotarse provocando en la célula una reacción de supervivencia consistente en un aumento del grosor de la pared celular, este engrosamiento dificulta y bloquea la entrada del antibiótico a la célula alterando la acción y por ende modificando la respuesta. Aunado a lo anterior, es menester evitar que el cultivo microbiano se encuentre en transición de fases, ya que entonces las células no tienen las mismas características estructurales y fisiológicas, lo que conduce a una acción antibiótica no uniforme con los consiguientes resultados erróneos.

II.2.C.g DURACION DEL PERIODO DE INCUBACION.

La duración del período de incubación es otro factor que debe ser considerado y estudiado en el desarrollo de métodos analíticos microbiológicos turbidimétricos.

Los períodos de incubación cortos no son suficientes para que el microorganismo alcance a superar la fase de adaptación al medio de cultivo; ésto trae como consecuencia la obtención de rela-

ciones gráficas dosis respuesta con curvas de crecimiento cuyas pendientes tienden a cero puesto que el crecimiento en todas las muestras es casi nulo. Los períodos prolongados no son adecuados puesto que al haber contacto entre el antibiótico y la suspensión microbiana durante un tiempo más largo, el antibiótico se agota como consecuencia de una unión irreversible de éste al ribosoma celular provocando que el número de células presentes no dependa de la cantidad de antibiótico presente, es decir que después de un período largo, el crecimiento microbiano es uniforme en todas las muestras.

II.2.C.h TEMPERATURA DE INCUBACION.

El metabolismo bacteriano al igual que el de todos los organismos se lleva a cabo mediante complejos sistemas bioquímicos tales como enzimas, vitaminas, etc., que dependen en gran medida de la temperatura. Mínimos cambios en ésta, originan cambios bioquímicos que se manifiestan en alteraciones en la velocidad con que se realizan las funciones metabólicas o bien, pueden ser tan graves que causan la muerte del organismo. En el caso de bacterias, la temperatura óptima de crecimiento varía de acuerdo al género pudiendo ser clasificados en psicrófilos, mesófilos y termófilos (27).

Aún para una misma especie microbiana, la velocidad de reproducción varía notablemente con cambios pequeños de temperatura. Garrett y Wright (25) demostraron claramente la importancia del efecto de la temperatura utilizando cultivos de Escherichia coli con 2 tubos inoculados con el mismo número de células (No) pero

incubados durante 20 minutos a 37 y 38°C respectivamente. Estos arrojaron los resultados en la Tabla No. 2.

Tabla No. 2. Resultados obtenidos en el experimento para probar la influencia de la temperatura en el crecimiento de una población bacteriana (25).

Tiempo de incubación (horas)	Número de células en el tubo, después de la incubación a	
	37°C	38°C
3	178 No	221 No
4	1005 No	1342 No

De acuerdo a estos resultados, diferencias de 1°C provocan que la velocidad de reproducción de un cultivo microbiano varíe en gran medida. Esto puede observarse en la diferencia en el número de células presentes en ambos tubos al final del período de incubación puesto que aunque ambos fueron inoculados con el mismo número la temperatura provoca diferencias en la velocidad de reproducción y por ende en el número de células al final del período.

Cuando se realizan análisis turbidimétricos, la incubación del microorganismo se lleva a cabo colocando los tubos de ensayo conteniendo al antibiótico y al microorganismo en baños de agua con temperatura perfectamente controlada y enteramente homogénea. Di-

ferencias de por ejemplo 0.2°C podrían causar una diferencia en la población microbiana que conducirían a resultados que naturalmente no serían válidos para el análisis puesto que la velocidad de crecimiento no sería uniforme ocasionando que el número de células presentes en los tubos después de la interacción sea incongruente con respecto al obtenido en los tubos que estuvieron a diferente temperatura. Para evitar toda posible fuente de error debido a una falta de homogeneidad en la temperatura del baño deben considerarse procedimientos prácticos tales como (25):

1. Aplicación del medio de cultivo a los tubos y distribución aleatoria de éstos, tanto los correspondientes al estándar como al problema.
2. El uso de medio de cultivo inoculados fríos (agitados antes de ser colocados en los tubos) de manera que el crecimiento inicie hasta que los tubos hayan sido colocados en el baño de agua para ser incubados.
3. El uso de tubos de forma y grosor uniforme de manera que la transferencia de calor sea uniforme en todos los tubos.
4. Usar un baño de agua con un sistema de agitación tal que permita que la temperatura sea homogénea y exacta en todo el baño o incubadora.

II.2.D METODOS REPORTADOS.

Para el análisis de muestras farmacéuticas conteniendo oxitetraciclina o clorhidrato de oxitetraciclina, la USP (1) describe un

método turbidimétrico que utiliza Staphylococcus aureus como microorganismo de prueba. La Farmacopea Británica describe 2 métodos en que utilizan Bacillus pumilus (12) y Bacillus cereus (variante mycoides) (11) como microorganismo de prueba.

III. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

El presente trabajo consistió en el estudio de un método microbiológico turbidimétrico para en base a dicho estudio, desarrollar una técnica de análisis cuantitativo de clorhidrato de oxitetraciclina. El método microbiológico turbidimétrico general se describe a continuación.

III.1 METODO TURBIDIMETRICO GENERAL.

III.1.A REACTIVOS Y EQUIPO.

- Espectrofotómetro con capacidad de detección a longitud de onda visible.
- Tina con termostato.
- Clorhidrato de oxitetraciclina estándar de referencia.
- Solución acuosa de formaldehído al 12%.
- Medio para Antibióticos No. 1.
- Medio para Antibióticos No. 3.

III.1.B PROCEDIMIENTO.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES ESTANDAR.

Preparar una solución patrón disolviendo una cantidad de clorhidrato de oxitetraciclina estándar de referencia exactamente pesada en HCl 0.1 N para tener una concentración final de 1 mg por ml. Mantener en refrigeración pudiendo utilizarse esta solución en un período de 4 días (1). El día del análisis, preparar

a partir de la solución patrón 5 o más soluciones diluidas del mismo, dispuestas en un intervalo, con una concentración media de 0.3 microgramos por mililitro, utilizando agua como diluyente.

PREPARACION DE LA SOLUCION PROBLEMA.

Preparar una solución patrón problema utilizando HCl 0.1 N como disolvente; a partir de ésta preparar una solución diluida del problema con una concentración lo más cercana posible a la dosis media de las soluciones estándar utilizando agua como diluyente.

PREPARACION DEL INOCULO.

Previo al análisis inocular con una cepa de Staphylococcus aureus ATCC 6538-P, un tubo de ensayo conteniendo Medio para Antibióticos No. 1. Distribuir el inóculo sobre la superficie de agar e incubar a 37°C durante aproximadamente 24 horas. Después de este período de tiempo preparar una suspensión reuniendo el crecimiento bacteriano en 50 ml de Solución Salina Isotónica Estéril (SSIE). Al momento del análisis diluir una porción de la suspensión adicionando SSIE y ajustar la transmitancia de la suspensión a 25% a 580 nm contra un blanco constituido por SSIE. Con la suspensión así ajustada, ajustar la concentración del medio de prueba agregando 0.1 ml de la suspensión por cada 100 ml de medio.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

El día del análisis añadir 1 ml de cada una de las soluciones diluidas tanto de estándar como de problema, a series de 3 tubos

cada una. Incluir 1 o 2 tubos blanco, los cuales tienen únicamente diluyente sin antibiótico y 1 o 2 tubos testigo que contengan diluyente sin antibiótico y medio de cultivo inoculado. Agregar 9 ml de medio de prueba sin inocular a cada tubo blanco y aleatoriamente adicionar 9 ml de medio de prueba inoculado a los tubos conteniendo las soluciones estándar y problema, mezclar e incubar a 37°C durante 2-3 horas. Agregar a cada tubo 0.5 ml de una solución diluida de formaldehído al 12%, mezclar vigorosamente y determinar espectrofotométricamente a 530 nm la turbidez de la suspensión (medida como porcentaje de transmitancia) de cada muestra, comparándola con la turbidez del tubo blanco.

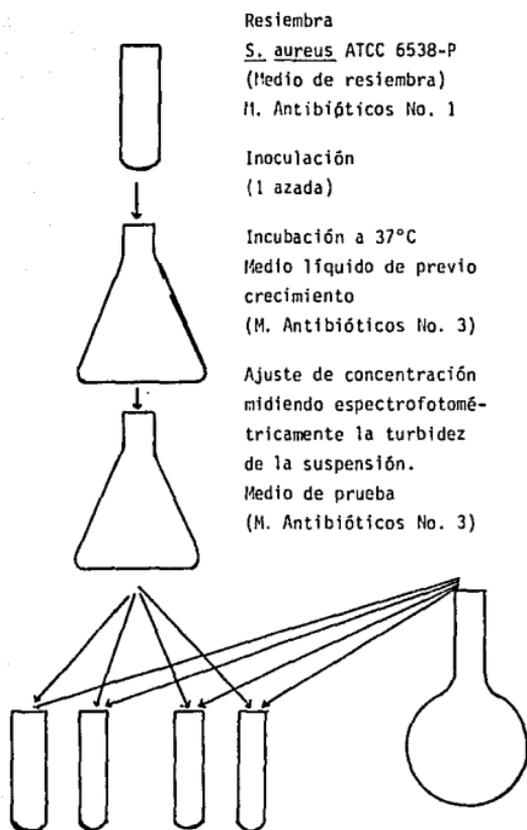
III.2 ESTUDIO DE VARIABLES.

El desarrollo experimental se inició con un estudio de las variables que ejercen influencia en un método turbidimétrico, utilizándose para ello un método turbidimétrico particular basado en el método general. Este método particular se describe a continuación.

Esquema No. 5

METODO MICROBIOLÓGICO TURBIDIMÉTRICO

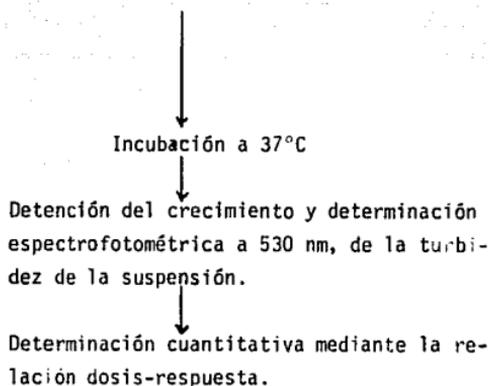
DIAGRAMA



VARIABLES A ESTUDIAR

- Tiempo de crecimiento en el medio de resiembra.
- Tiempo de crecimiento en el Medio líquido previo al análisis.
- Concentración de la suspensión microbiana en el medio de prueba.
- Estudio de la solubilidad del antibiótico en el disolvente
- Influencia de la presencia de residuos orgánicos en el material.

Preparación
de solucio-
nes diluidas



Esquema No. 5. Método Microbiológico turbidimétrico (continuación).

III.2.A DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES EN ESTUDIO.

- TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE RESEMBRA.

Se refiere al número de días anteriores a la inoculación del medio líquido de previo crecimiento (Esquema No. 5) en que se debe sembrar el microorganismo de prueba con el objeto de tener células jóvenes.

- TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO LIQUIDO DE PREVIO CRECIMIENTO.

Es el número de días anteriores al análisis en que se debe inocular el medio líquido a partir del cultivo sembrado con el objeto de homogenizar las células y adaptarlas a un medio de rápido crecimiento.

- CONCENTRACION DE LA SUSPENSION MICROBIANA EN EL MEDIO DE PRUEBA.

Se refiere al número de células microbianas presentes en el medio de prueba durante la interacción con las soluciones diluidas del antibiótico, es decir la turbidez del medio de prueba medi-

da espectrofotométrica ente a 650 nm como % de transmitancia.

- ESTUDIO DE LA SOLUBILIDAD DEL ANTIBIÓTICO EN EL DISOLVENTE.

Se refiere a la influencia del disolvente utilizado en la solubilidad y estabilidad de la oxitetraciclina como clorhidrato.

- INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS CONTAMINANTES EN EL MATERIAL UTILIZADO.

Es el estudio de la posible interferencia en el desarrollo del análisis de residuos presentes en el material utilizado provenientes del agua y detergente utilizados, y la manera de eliminar dichos residuos.

- TIEMPO DE INCUBACION.

Es la duración del período en que se mantiene en incubación la suspensión microbiana en contacto con las distintas soluciones diluidas del antibiótico a analizar.

La temperatura a la cual se mantuvo en incubación el microorganismo también es de suma importancia pero se mantuvo constante en 37°C durante todo el estudio.

III.2.B ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA SUSPENSION MICROBIANA, TIEMPO DE INCUBACION Y TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO LIQUIDO PREVIO AL ANALISIS.

III.2.B.a ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LAS VARIABLES.

De acuerdo a la bibliografía disponible (25(26) se sabe

que estas variables dependen entre sí en gran medida por lo que para la primera fase del estudio se realizó un experimento que permitiera observar el comportamiento de cada una de ellas cuando varían las otras. El experimento se realizó de acuerdo a la Tabla No. 3. Las letras representan los distintos experimentos realizados.

El estudio se realizó efectuando determinaciones analíticas de clorhidrato de oxitetraciclina materia prima siguiendo el método turbidimétrico modificado antes descrito.

Para estudiar la influencia de la concentración de la suspensión microbiana se utilizaron medios de prueba ajustados espectrofotométricamente a 650 nm, a partir de medios líquidos con previo crecimiento, a 3 diferentes valores de concentración de células microbianas medida como porciento de transmitancia, las cuales fueron 85, 92 y 98 respectivamente.

Concentración de la suspensión microbiana (% de T)	Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días)	Tiempo de incubación (horas)			
		1:00	2:30	1:00	2:30
85	1	A	J	A'	J'
	4	B	K	B'	K'
	7	C	L	C'	L'
92	1	D	M	D'	M'
	4	E	N	E'	N'
	7	F	N	F'	N'
98	1	G	O	G'	O'
	4	H	P	F'	P'
	7	I	Q	I'	Q'

Tabla No. 3. Diagrama de los experimentos realizados en el estudio de la interacción de las variables.

Con el fin de estudiar la influencia en el análisis de los diferentes tiempos de previo crecimiento en el medio líquido, se elaboró un calendario de análisis y conforme a éste, los medios de cultivo fueron inoculados 1, 4 o 7 días dependiendo del caso (Tabla No. 3) antes de las fechas de los análisis, a partir de los cultivos de S. aureus resemebrados previamente.

Para evaluar los resultados a los diferentes tiempos de incubación, los tubos de ensayo conteniendo la suspensión microbiana y al antibiótico fueron muestreados 1:00 y 2:30 horas después de permanecer en incubación a 37°C y se determinó la turbidez de cada muestra a 530 nm contra un blanco constituido por diluyente y medio de cultivo sin haber sido inoculado.

Para tratar de disminuir la influencia de factores externos todos los experimentos se realizaron por duplicado (experimentos representados por letras) y el orden seguido en su realización fue aleatorio.

En análisis microbiológicos en general, el crecimiento microbiano se evalúa cuantitativamente (25)(26) mediante relaciones matemáticas y gráficas entre la dosis (concentración de antibiótico) y la respuesta (crecimiento bacteriano durante la interacción), en el caso particular de métodos turbidimétricos, la respuesta se refiere a la turbidez de la suspensión microbiana medida como porcentaje de transmitancia, en el caso particular de clorhidrato de oxitetraciclina a una longitud de onda de 530 nm.

Con el objeto de visualizar y estudiar de manera óptima el

comportamiento del crecimiento microbiano a lo largo de la interacción, en este trabajo el análisis de resultados se hizo en base a relaciones respuesta dosis. En el establecimiento de las condiciones metodológicas óptimas de las variables en estudio, se consideraron los siguientes criterios:

a) Tipo y forma de la relación dosis-respuesta.

El tipo y forma de la curva de la relación dosis respuesta depende de manera muy importante de la cantidad de células microbianas presentes en el medio de cultivo y de la duración del tiempo de incubación (II.2.C.e y II.2.C.g).

b) Pendiente de las curvas dosis-respuesta.

c) Dispersión entre resultados correspondientes al mismo tratamiento.

Representa el grado de dispersión de los resultados de cada una de las muestras correspondientes a cada una de las soluciones de la curva estándar, con respecto al valor promedio de cada una de dichas soluciones estándar en un tratamiento dado, y se representa gráficamente por los valores de porcentaje de transmitancia de cada una de las muestras, es decir los puntos trazados alrededor de las líneas en las gráficas.

Los resultados obtenidos se evaluaron matemática y gráficamente de acuerdo a las relaciones dosis respuesta antes descritas. Los resultados de cada experimento se graficaron y se determinó la pendiente de cada una de las líneas obtenidas (Tabla No. 4). La pendiente se calculó como $m = \frac{T_2 - T_1}{C_2 - C_1}$ donde T es transmitancia y

C la concentración expresada en mcg/ml.

Tabla No. 4. Tabla que muestra los valores de las pendientes de las curvas dosis respuesta de los resultados obtenidos en los distintos experimentos.

Concentración de la suspensión microbiana (% de T)	Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días)	Tiempo de incubación (horas)			
		1:00	2:30	1:00	2:30
85	1	0.21	0.48	0.27	0.49
	4	0.04	0.31	0.07	0.33
	7	0.04	0.24	0.02	0.31
92	1	0.19	0.48	0.18	0.46
	4	0.09	0.37	0.03	0.37
	7	0.09	0.19	0.14	0.18
98	1	0.03	0.12	0.08	0.18
	4	0.02	0.21	0.02	0.24
	7	0.02	0.16	0.03	0.19

En el trazo de las gráficas se consideraron constantes dos de las variables para observar el comportamiento de éstas cuando varió una tercera. En las gráficas 1, 2 y 3 se consideró como variable el tiempo (días) de crecimiento en el medio líquido previo al análisis manteniendo constantes en cada gráfica la concentración de la suspensión microbiana (turbidez del medio de prueba) en 85% 92% y 98% de transmitancia respectivamente y el tiempo de incuba-

ción en una hora.

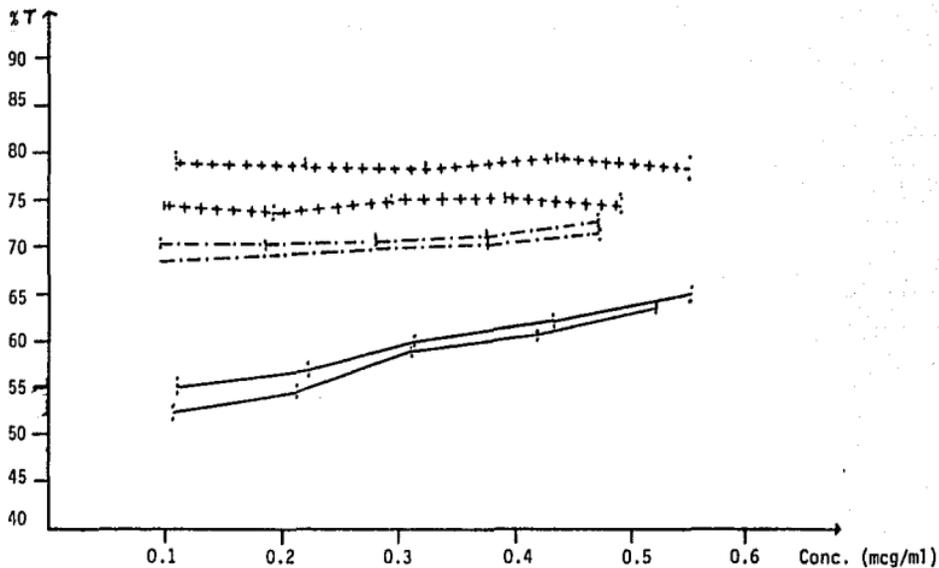
Las gráficas 7, 8 y 9 sirvieron para estudiar el efecto de la variación de la cantidad de células microbianas (concentración) sobre las constantes tiempo de incubación, 1 hora y el tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis, correspondiente a cada gráfica 1, 4 y 7 días respectivamente.

En las gráficas 4, 5 y 6 se consideraron las mismas constantes y variables que en las gráficas 1, 2 y 3 variando únicamente el valor del tiempo de incubación siendo de 2.30 horas en el caso de las gráficas 4, 5 y 6. Igualmente ocurrió en el caso de las gráficas 10, 11 y 12 con relación a las gráficas 7, 8 y 9, es decir se conservan las constantes y variables de estas últimas variando únicamente el tiempo de incubación de 1:00 a 2:30 horas.

OBSERVACIONES CONSIDERANDO LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA SUSPENSION MICROBIANA EN EL MEDIO DE PRUEBA, SOBRE EL TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO LIQUIDO PREVIO AL ANALISIS.

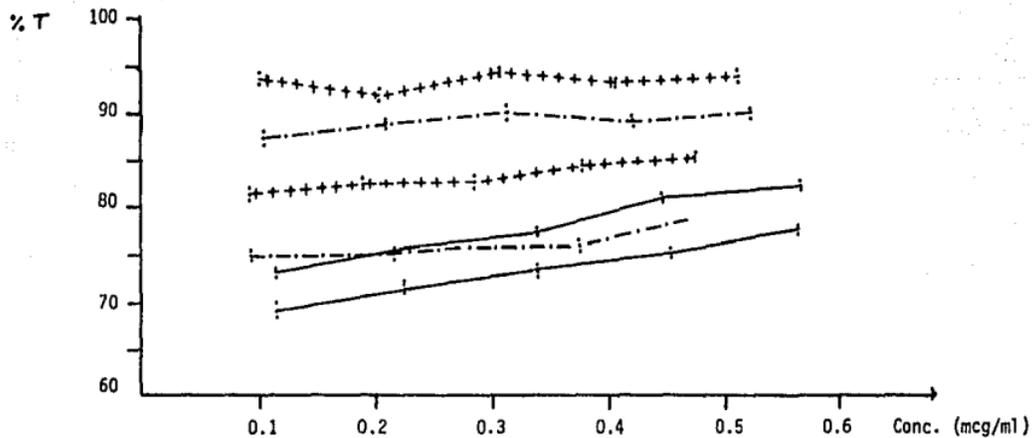
TIEMPO DE INCUBACION 1:00 HORA.

De acuerdo a las gráficas dosis respuesta de los resultados obtenidos, se observó que el crecimiento microbiano no fue abundante (gráficas 1, 2 y 3) en las muestras especialmente en los casos en que se utilizaron medios de prueba con 7 días de crecimiento; el crecimiento fue mayor en los experimentos en que la concentración fue mayor. También se observó un efecto antibiótico uniforme, es decir, no hubieron cambios significativos en el número de células



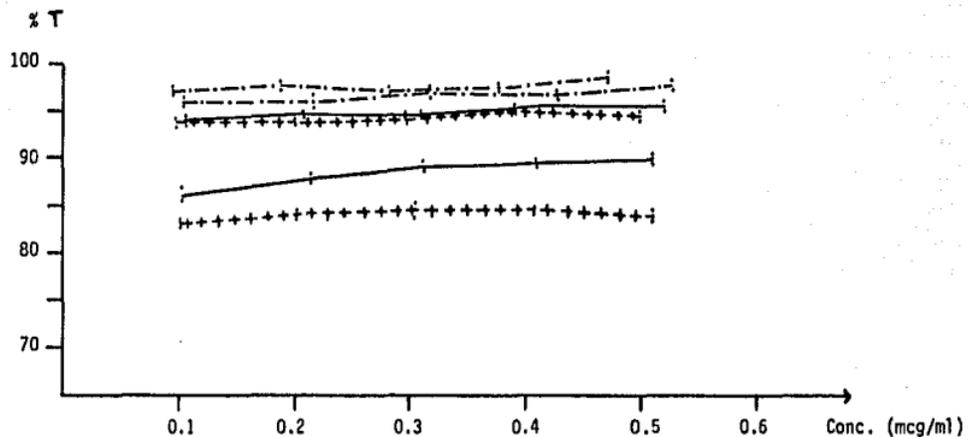
Gráfica No. 1. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Concentración de la suspensión microbiana (% T): 85
 Tiempo de incubación: 1.00 hora.
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días):

1 —————
 4 - - - - -
 7 ++++++



Gráfica No. 2. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Concentración de la suspensión microbiano (% T): 92
 Tiempo de incubación (horas): 1:00
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días):

1 —————
 4 - - - - -
 7 ++++++



Gráfica No. 3. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Concentración de la suspensión microbiana (% T): 98
 Tiempo de incubación (horas) 1.00
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días):

1 ———
 4 - - - -
 7 + + + +

microbianas presentes en muestras conteniendo concentraciones diferentes de antibiótico, ésto es, la pendiente de las curvas obtenidas fue muy pequeña casi cero (Tabla No. 4). La pendiente se modificó ligeramente únicamente en los casos de experimentos realizados con cultivos con un día de crecimiento en el medio líquido (Tabla No. 4). En el caso de la concentración 98% de transmitancia (Gráfica No. 3) las curvas mostraron pendientes muy pequeñas. Con el mismo tiempo de crecimiento previo pero con mayores concentraciones, aumentó la pendiente de las curvas (gráficas 1, 2, Tabla No. 4).

También se observó que en los casos en que se utilizó el valor más alto de concentración microbiana (Gráfica No. 1) las líneas correspondientes al mismo experimento se comportaron de manera muy parecida, es decir se agruparon mejor de acuerdo a los días de previo crecimiento en el medio líquido.

La dispersión entre resultados correspondientes al mismo experimento no se vió afectada ni por el tiempo de previo crecimiento, ni por los distintos niveles de concentración utilizados aunado a que dicha dispersión permaneció homogénea a lo largo de las 5 distintas concentraciones de antibiótico.

TIEMPO DE INCUBACION 2:30 HORAS.

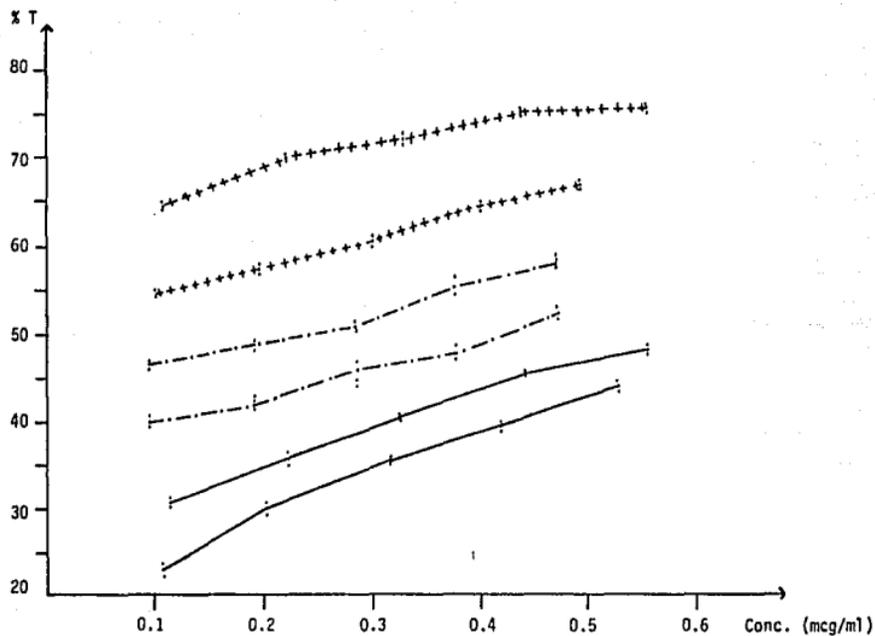
Al aumentar el tiempo de incubación del microorganismo en el medio de prueba se observó que en todos los casos aumentó la cantidad de crecimiento microbiano con relación al obtenido con un tiempo de incubación de 1:00 hora. Los experimentos en que el

medio de prueba alcanzó mayor turbidez (menor porcentaje de transmitancia) fueron aquellos casos correspondientes a análisis realizados con medios de cultivo con un día previo de crecimiento (Gráficas 4, 5 y 6) además, dicha turbidez aumentó conforme aumentó la concentración de la suspensión microbiana (Gráfica No. 4).

La pendiente de las curvas en todos los casos se incrementó cuando fue mayor la concentración de la suspensión microbiana (Tabla No. 4) siendo ésta mayor en el caso en que la concentración inicial del medio de prueba se ajustó a 85% de transmitancia. Se observó que al aumentar la concentración de la suspensión microbiana, las líneas correspondientes a tratamientos idénticos tuvieron comportamientos similares, es decir se agruparon mejor de acuerdo al tiempo de crecimiento en el medio líquido de previo crecimiento (Gráfica No. 4).

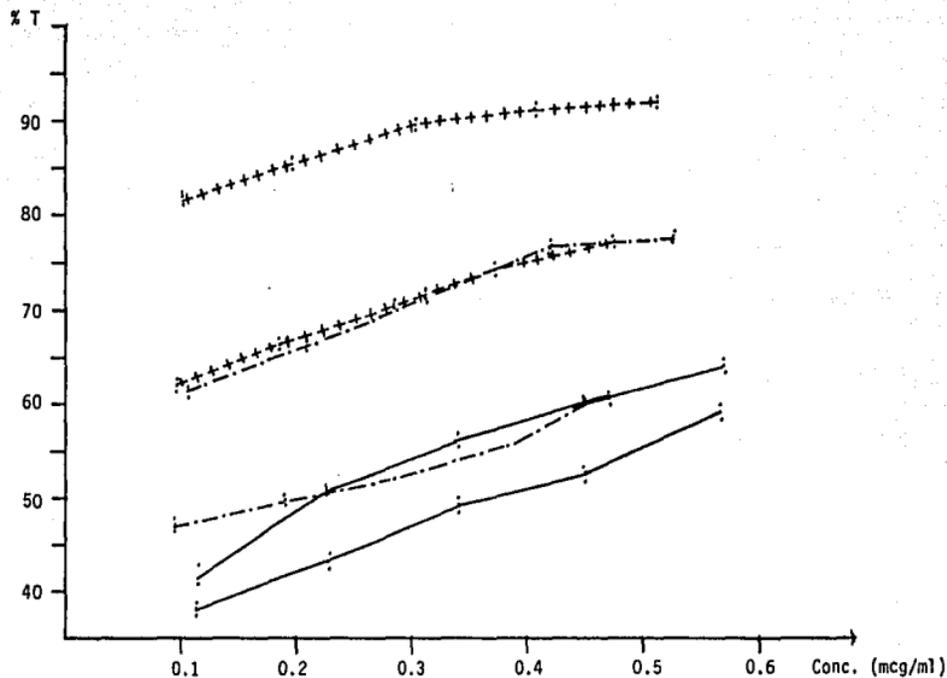
La dispersión de resultados correspondiente al mismo tratamiento no se vio afectado ni por el tiempo de incubación ni por los distintos niveles de concentración, además la dispersión permaneció sin cambio a lo largo de las 5 concentraciones de antibiótico utilizadas.

Las pendientes de todas las curvas aumentaron conforme se incrementó el tiempo de incubación de 1:00 hora a 2:30 horas (Tabla No. 4) lo cual pudo explicarse considerando que en los casos en que el cultivo microbiano estuvo en incubación a 37°C durante una hora, la célula microbiana estuvo en fase de adaptación al medio de prueba (II.2.C.f) por lo que el crecimiento fue aproximadamente el mis-



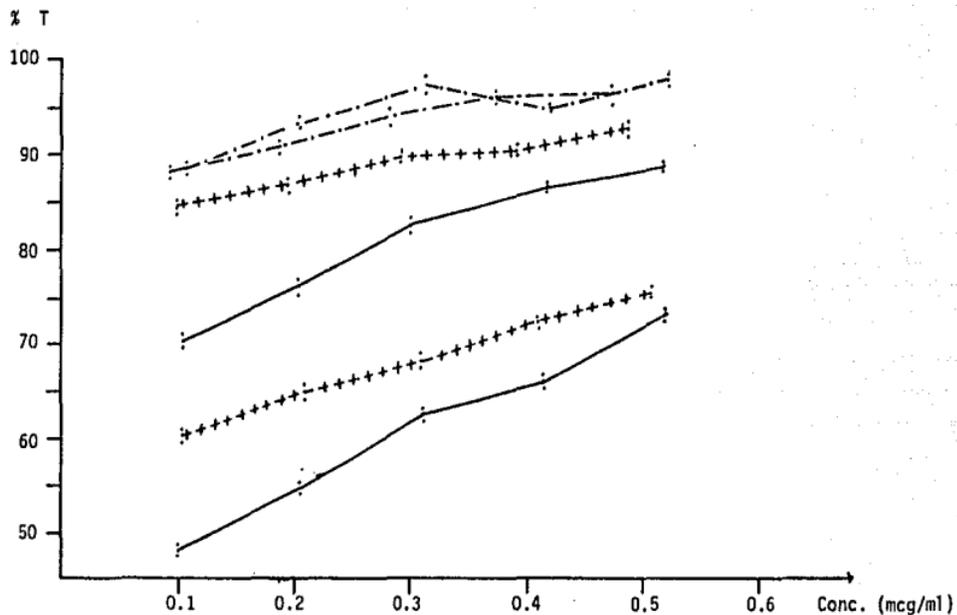
Gráfica No. 4. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Concentración de la suspensión microbiana (% T): 85
 Tiempo de incubación (horas): 2.30
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (dfas):

1 ———
 4 - - - -
 7 + + + +



Gráfica No. 5. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Concentración de la suspensión microbiana (% T): 92
 Tiempo de incubación (horas): 2.30
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (dfas):

1 ———
 4 - - - -
 7 + + + +



Gráfica No. 6. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Concentración de la suspensión microbiana (% T): 98
 Tiempo de incubación (horas): 2.30
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días):

1 ———
 4 - - - -
 7 + + + + +

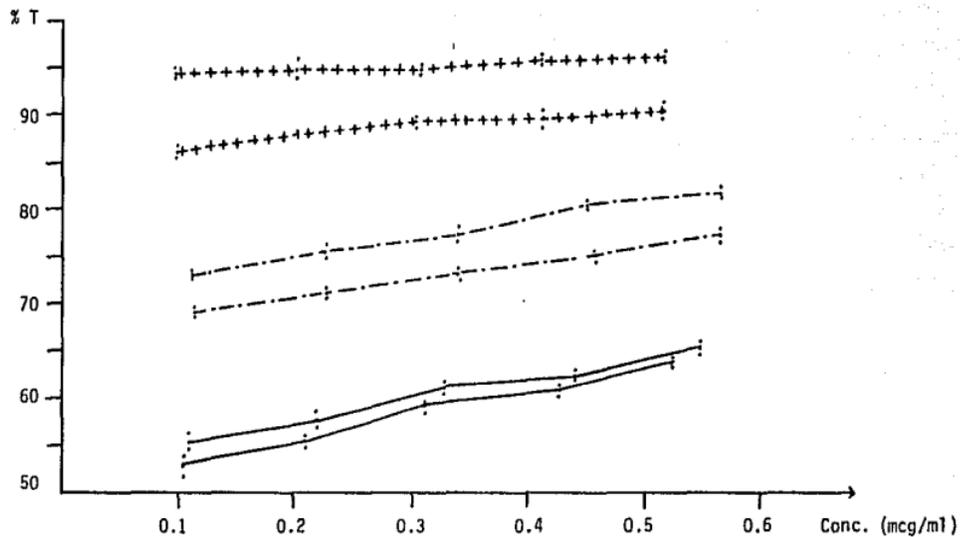
mo en todos los tubos conteniendo las muestras de antibiótico, e independiente de la cantidad presente en dichas muestras. Después de 2:30 horas, el microorganismo ya adaptado fue capaz de crecer en las distintas muestras en relación a la cantidad de antibiótico presente en ellas lo que originó el aumento tan marcado en los valores obtenidos de sus pendientes.

OBSERVACIONES CONSIDERANDO EL TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO LIQUIDO PREVIO AL ANALISIS SOBRE LA CONCENTRACION DE LA SUSPENSION MICROBIANA EN EL MEDIO DE PRUEBA.

TIEMPO DE INCUBACION 1:00 HORA.

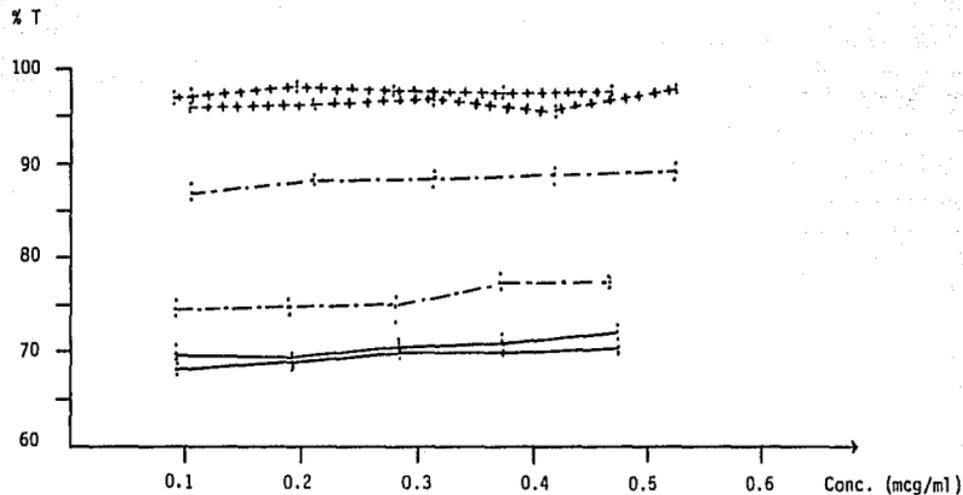
La cantidad de crecimiento microbiano en las muestras se vió modificado al variar el tiempo de previo crecimiento. De acuerdo a las gráficas 7, 8 y 9 fue posible observar que al utilizar medios de prueba con concentraciones iniciales de células microbianas iguales, se obtuvo un crecimiento más abundante al disminuir el tiempo de crecimiento previo, alcanzándose el máximo, con un día de previo crecimiento (Gráfica No. 7).

La forma y el grado de inclinación de las curvas obtenidas en cada experimento también se vieron afectadas por el tiempo de previo crecimiento. La pendiente de todas las curvas se incrementaron conforme disminuyó el tiempo de previo crecimiento (Tabla No. 4). El grado de aumento de las pendientes de las curvas correspondientes a medios de prueba con concentraciones iguales dependió del tiempo de previo crecimiento. Con medios de 7 días, el grado de aumento fue menor que en el caso 4 días y éstos a su vez menores



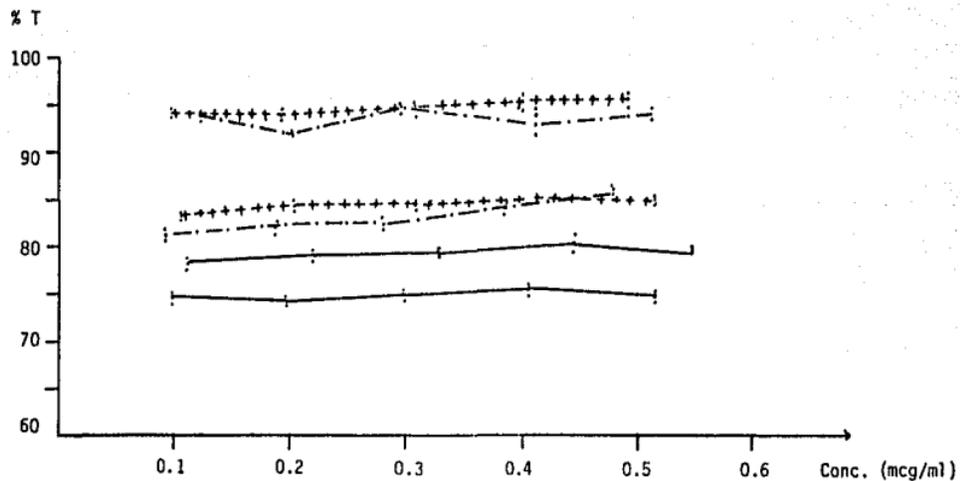
Gráfica No. 7. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días): 1
 Tiempo de incubación (horas) 1.00
 Concentración de la suspensión microbiana (% T):

85 ———
 92 - · - · -
 98 + + + + +



Gráfica No. 8. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta % T
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días): 4
 Tiempo de incubación (horas): 1.00
 Concentración de la suspensión microbiana (% T):

85 ———
 92 - · - · -
 98 - - - -



Gráfica No. 9. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días): 7
 Tiempo de incubación (horas): 1.00
 Concentración de la suspensión microbiana (% T):

85 ———
 92 - - - -
 98 + + + + +

que en el caso de un día (Tabla No. 4, Gráficas 7, 8 y 9).

Se observó que cuando aumentó el tiempo de previa resiembra las líneas obtenidas al graficar los resultados de los experimentos no mostraron comportamientos definidos dependientes de las distintas concentraciones de las suspensiones microbianas utilizadas, es decir líneas correspondientes a experimentos diferentes, se superpusieron unas a otras, obteniéndose la mejor separación de líneas cuando se trabajaron medios con un día de crecimiento en el medio líquido previo al análisis.

TIEMPO DE INCUBACION 2:30 HORAS.

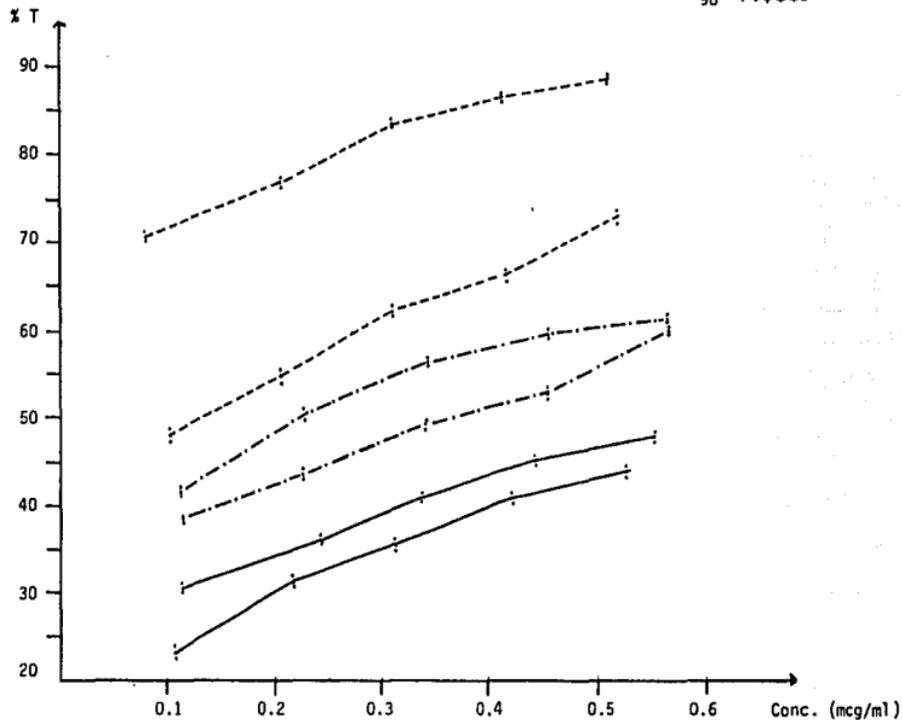
Al igual que el caso en que el tiempo de incubación fue de una hora, con 2:30 horas el crecimiento microbiano en las muestras estuvo en función del tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (Gráficas 10, 11 y 12). Dicho crecimiento en el medio de prueba aumentó conforme disminuyó el tiempo de previo crecimiento lográndose el mayor crecimiento con el medio con un día de crecimiento en el medio líquido previo al análisis.

La pendiente de las curvas obtenidas en los experimentos mostraron aumentos cuando disminuyó el tiempo de previo crecimiento (Tabla No. 4, Gráficas 10, 11 y 12) y el grado de aumento de las pendientes de las curvas estuvo en función del tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis, obteniéndose el mayor aumento con el menor tiempo de crecimiento previo, es decir con un día.

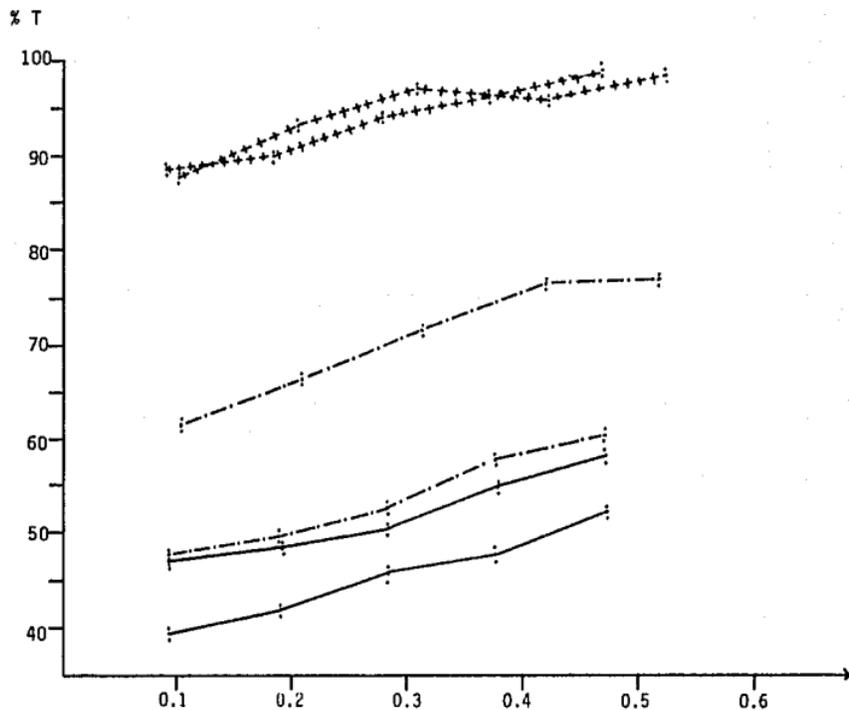
Las curvas obtenidas no mostraron comportamientos defini-

Tiempo de incubación (horas): 2.30
Concentración de la suspensión microbiana (% T)

85 ———
92 - - - -
98 + + + + +

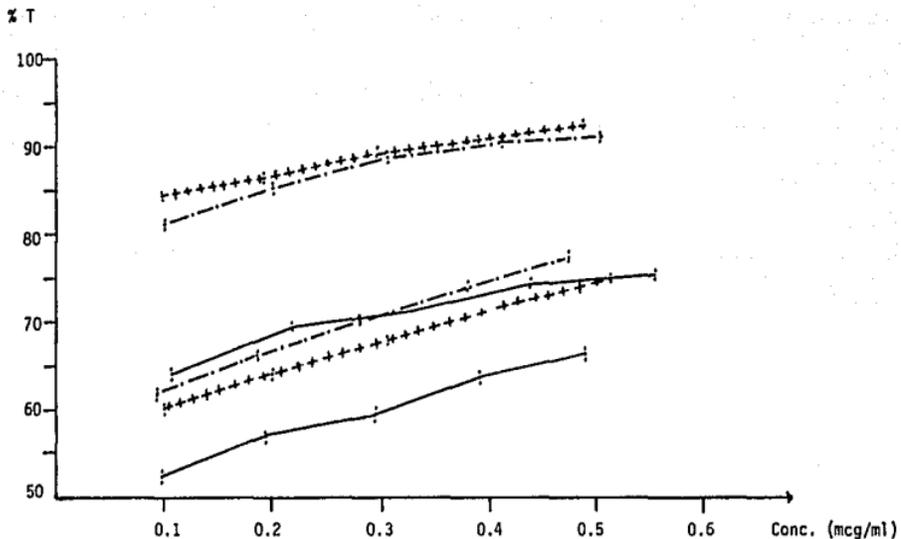


Gráfica No. 10. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días): 1



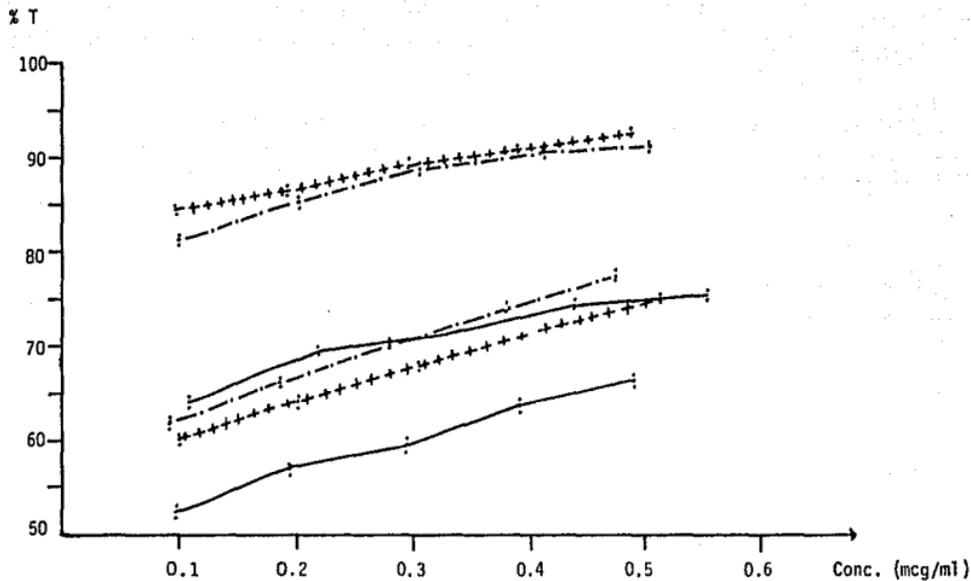
Gráfica No. 11. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días): 4
 Tiempo de incubación (horas): 2.30
 Concentración de la suspensión microbiana (% T):

85 —
 92 -.-
 98 +++++



Gráfica No. 12. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Tiempo de incubación: 2:30 (horas)
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (dfas): 7
 Concentración de la suspensión microbiana (% T)

85 ———
 92 - - - -
 98 + + + +



Gráfica No. 12. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Tiempo de incubación: 2.30 (horas)
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días): 7
 Concentración de la suspensión microbiana (% T)

85 ———
 92 - - - -
 98 + + + + +

dos con 7 días de previo crecimiento, mientras que con un día se agruparon de mejor manera en función de los distintos niveles de concentración microbiana.

Al aumentar el tiempo de incubación y comparar los resultados las líneas mostraron aumentos en el valor de sus pendientes (Tabla No. 4) explicándose ésto debido a que en períodos de incubación de una hora, el microorganismo aún está en fase de adaptación al medio de prueba, mientras que con 2:30 horas después de iniciarse el período de incubación el microorganismo ya está adaptado y entonces su crecimiento depende directamente de la cantidad de antibiótico presente en las muestras definiéndose así de mejor manera las líneas de crecimiento.

La dispersión entre resultados correspondientes al mismo experimento permaneció sin cambio al variar la concentración de la suspensión microbiana, el tiempo de incubación y el tiempo de previo crecimiento. Así mismo la dispersión permaneció homogénea a lo largo de las 5 concentraciones de antibiótico utilizadas.

En base a la evaluación matemática del crecimiento microbiano a través de las relaciones dosis respuesta de los resultados obtenidos experimentalmente, en este trabajo la elección de las condiciones experimentales más adecuadas se hizo en base al valor de la pendiente de las curvas. Considerando ésto, el experimento ideal es aquel en que la pendiente de las líneas obtenidas sea lo más cercana a uno puesto que así, cambios en una de las variables se manifestarán en aproximadamente igual proporción en la otra va-

riable.

III.2.B.b DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE LA SUSPENSION MICROBIANA EN EL MEDIO DE PRUEBA.

La serie anterior de experimentos permitió observar y evaluar el comportamiento de las variables estudiadas. Se utilizaron varios parámetros de referencia siendo el más importante el valor de la pendiente de la curva.

Los resultados del experimento anterior permitieron tener una idea general del comportamiento de las variables de manera que el experimento en el cual las curvas obtenidas tuvieron mayor pendiente (.48, .49) fue con el menor tiempo de previo crecimiento (1 día), con la mayor concentración de células microbianas en el medio de prueba (85% de transmitancia) y con un tiempo de incubación de 2:30 horas. En base a esto, se hizo otra serie de experimentos para estudiar que pasaba al aumentar la concentración de células en el medio de prueba, puesto que el estudio anterior mostró que de esta manera podía mejorarse el valor de la pendiente.

Se estudiaron 3 diferentes valores de concentración microbiana medidas como porciento de transmitancia las cuales fueron 85%, 75% y 65% respectivamente, manteniendo constantes el tiempo de incubación en 2:30 horas y el tiempo de previo crecimiento en un día. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado con el objeto de disminuir la influencia de factores externos, además el orden seguido para efectuar los experimentos fue aleatorio. Las

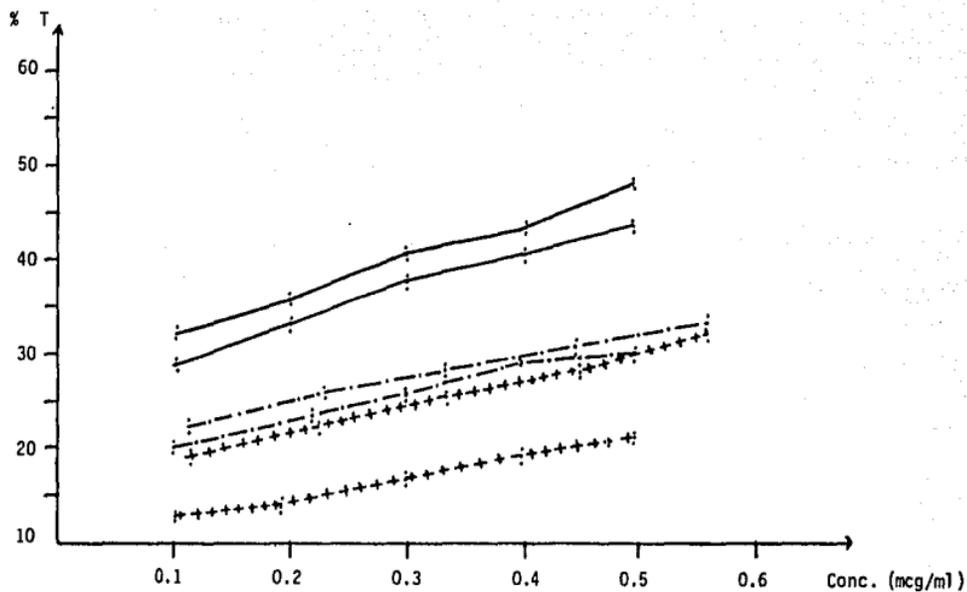
pendientes de las curvas obtenidas en las relaciones dosis respuesta se muestran en la Tabla No. 5.

Los resultados de porcentaje de transmitancia se graficaron (Gráfica No. 13) y se pudo observar que las curvas de crecimiento se definieron mejor conforme disminuyó la concentración de la suspensión microbiana, es decir a 85% de transmitancia. La pendiente de las curvas (Tabla No. 5) disminuyó cuando aumentó la concentración de la suspensión obteniéndose los mayores valores de pendiente con los medios cuya turbidez fue 85% de transmitancia (Tabla No. 5).

Este experimento en combinación con los anteriores sirvieron para concluir que la concentración microbiana óptima del medio de prueba es decir, que el análisis se debe realizar ajustando el medio de prueba espectrofotométricamente a una longitud de onda de 650 nm a un valor de transmitancia del 85%.

Tabla No. 5. Valores de pendientes de las curvas dosis-respuesta de los resultados en la determinación de la concentración microbiana óptima.

Concentración de la suspensión microbiana (% de T)	Pendiente de las curvas	
85	0.38	0.39
75	0.22	0.22
65	0.18	0.21



Gráfica No. 13. Relación dosis (conc. de antibiótico)-respuesta (% T)
 Tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis (días): 1
 Tiempo de incubación (horas): 2.30
 Concentración de la suspensión microbiana (% T):

85 —————
 75 - - - - -
 65 + + + + +

III.2.B.c DETERMINACION DEL TIEMPO DE INCUBACION OPTIMO.

Después de haber determinado la concentración de la sus pensión microbiana óptima en el medio de prueba, se hizo otra serie de experimentos para estudiar la influencia en la curva de cre cimiento, de otros valores de tiempo de incubación manteniendo cons tantes las variables ya estudiadas, para determinar cual es el tiem po óptimo de incubación del medio de prueba.

Se estudiaron 3 diferentes tiempos de incubación los cuales fueron 2:00, 2:30 y 4:00 horas respectivamente siguiendo el método microbiológico en estudio. Con el fin de disminuir la influencia de factores externos, los experimentos se efectuaron por duplicado y el orden seguido en su realización fue aleatorio. Las pendientes de las curvas dosis respuesta de los resultados experimentales se muestran en la Tabla No. 6.

Tabla No. 6. Valores de pendientes de las curvas dosis respuesta de los resultados del estudio de determinación del tiempo de incubación óptimo.

Tiempo de incubación (horas)	Pendiente de las curvas	
2:00	0.31	0.33
2:30	0.41	0.38
4:00	0.41	0.38

Los resultados se graficaron (Gráfica No. 14) y de acuerdo a ésta se pudo observar que las pendientes de las curvas de crecimiento aumentaron cuando el tiempo de incubación aumentó de 2:00 a 2:30 pero se mantuvieron invariables cuando el tiempo aumentó a 4:00 horas (Tabla No. 6) y se seleccionó el tiempo 2:30 debido a que siendo iguales los resultados a las 2:30 y 4:00 horas, no tiene caso esperar a las 4:00 horas.

La dispersión entre resultados correspondientes al mismo experimento no se vió afectada por la duración del período de incubación. Dicha dispersión fue homogénea a lo largo de las 5 distintas concentraciones de las soluciones estándar. Esta dispersión se representó en la gráfica por los valores de porciento de transmitancia de cada una de las muestras (puntos) dibujados alrededor de las curvas.

Después de todos los experimentos se concluyó que las variables quedaron establecidas de la siguiente manera:

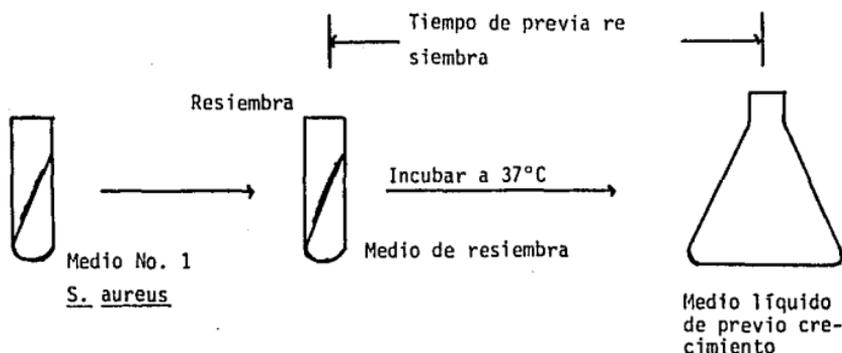
Ajustar la turbidez del medio de prueba espectrofotométricamente a una longitud de onda de 650 nm a 85% de transmitancia a partir de un medio de cultivo líquido con un día de previo crecimiento. Incubar las muestras a 37°C durante un período de 2:30 horas.

III.2.C ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CRECIMIENTO DEL MICROORGANISMO EN EL MEDIO DE RESIEMBRA.

A lo largo de todo el estudio anterior se utilizó un cul-

tivo microbiano con un día de crecimiento en el medio de resiembra. Una vez establecidas las variables anteriores se procedió a estudiar la influencia del tiempo de crecimiento en el medio de resiembra en el método turbidimétrico. El tiempo de crecimiento en el medio de resiembra se refiere al tiempo que transcurre entre la resiembra de la cepa microbiana y la inoculación del medio líquido de previo crecimiento con la cepa resembrada anteriormente, o bien al tiempo previo a la inoculación del medio líquido de previo crecimiento en que se debe resembrar el microorganismo a un medio de cultivo sólido (Esquema No. 5).

Para este estudio se realizaron diversos experimentos consistentes en determinaciones analíticas de clorhidrato de oxitetraciclina materia prima siguiendo la técnica turbidimétrica en estudio utilizando cultivos microbianos con tiempos de crecimiento en el medio de resiembra diferentes, los cuales fueron 9 horas, 1, 2 y 4 días respectivamente. Las determinaciones analíticas se hicieron



Esquema No. 5. Diagrama que muestra el significado del tiempo de crecimiento en el medio de resiembra considerando la técnica microbiológica turbidimétrica utilizada.

por duplicado y los resultados se muestran en la Tabla No. 7 y se refieren al porciento de transmitancia de cada muestra de cada una de las soluciones estándar (método 5+ 1) después de la interacción con la suspensión bacteriana.

Tabla No. 7. Resultados (% de T) de cada una de las soluciones estándar de los experimentos del estudio de la influencia del tiempo de previo crecimiento.

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE PREVIA RESIEMBRA: 9 HORAS

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	32.3	35.7	40.4	30.1	47.6
	33.0	32.0	34.8	36.4	46.5
	29.8	36.3	35.3	33.7	39.0
	25.1	30.1	38.4	40.0	42.4
PROMEDIO	30.05	33.52	37.22	35.05	43.87
DESV. ESTANDAR	3.574	2.971	2.649	4.189	3.946

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE PREVIA RESIEMBRA: 9 HORAS

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	29.7	32.6	37.4	40.0	47.4
	29.8	34.0	40.8	40.3	45.2
	36.4	28.2	32.6	45.6	46.9
	24.2	37.5	33.0	37.4	37.0
PROMEDIO	30.02	33.07	35.95	40.82	44.12
DESV. ESTANDAR	4.991	3.84	3.896	3.439	4.752

Tabla No. 7. Resultados (% de T) de cada una de las soluciones estándar de los experimentos del estudio de la influencia del tiempo de previo crecimiento.

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE PREVIA RESIEMBRA: 1 DIA

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	30.2	32.4	35.7	39.2	43.6
	30.6	33.0	35.8	39.5	43.2
	30.0	32.6	36.2	39.0	42.9
	30.4	32.8	36.0	39.4	43.1
PROMEDIO	30.3	32.7	35.9	39.2	43.1
DESV. ESTANDAR	0.258	0.365	0.222	0.223	0.294

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE PREVIA RESIEMBRA: 1 DIA

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	33.4	34.2	36.5	38.9	41.0
	32.9	34.0	36.8	39.4	41.2
	32.9	34.3	37.2	39.6	41.5
	33.0	34.6	37.0	39.0	41.0
PROMEDIO	33.05	34.3	36.9	39.2	41.2
DESV. ESTANDAR	0.238	0.260	0.298	0.33	0.236

Tabla No. 7. Resultados (% de T) de cada una de las soluciones estándar de los experimentos del estudio de la influencia del tiempo de previo crecimiento (Continuación).

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE RESIEMBRA: 2 DIAS

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	32.3	36.2	40.2	43.3	47.4
	40.2	37.7	41.0	41.0	42.8
	31.3	34.4	43.3	41.3	39.8
	27.7	29.8	32.9	37.7	48.0
PROMEDIO	32.87	34.52	39.35	40.82	44.5
DESV. ESTANDAR	5.268	3.427	4.496	2.322	3.97

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE RESIEMBRA: 2 DIAS

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	27.8	39.8	48.5	46.2	48.5
	31.4	40.5	40.4	47.7	49.7
	33.8	33.1	36.5	36.3	50.9
	25.6	30.6	44.7	41.4	45.8
PROMEDIO	29.66	36.0	42.52	42.9	48.72
DESV. ESTANDAR	3.656	4.908	5.204	5.155	2.182

Tabla No. 7. Resultados (% de T) de cada una de las soluciones estándar de los experimentos del estudio de la influencia del tiempo de previo crecimiento (Continuación).

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE RESIEMBRA: 4 DIAS

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	35.4	39.7	43.6	45.8	48.0
	37.4	40.8	45.4	48.8	46.1
	35.4	33.5	40.2	49.4	40.7
	32.9	32.6	37.4	40.2	43.3
PROMEDIO	35.27	36.55	41.65	46.05	44.52
DESV. ESTANDAR	1.843	4.197	3.542	4.206	3.198

TIEMPO DE CRECIMIENTO EN EL MEDIO DE RESIEMBRA: 4 DIAS

SOLUCION ESTANDAR	A(%T)	B(%T)	C(%T)	D(%T)	E(%T)
	32.1	34.1	30.9	44.2	46.1
	29.3	33.8	30.3	47.1	47.1
	35.4	40.7	36.8	39.7	38.4
	32.2	38.7	40.4	36.8	43.4
PROMEDIO	32.25	36.82	34.6	41.95	43.75
DESV. ESTANDAR	2.493	3.421	4.648	4.589	3.894

Los resultados obtenidos en análisis efectuados con cultivos microbianos con 9 horas, 2 y 4 días de crecimiento en el medio de resiembra se encontraron muy dispersos (Tabla No. 7) y mos-

traron una gran dispersión entre los correspondientes a una misma solución de antibiótico estándar encontrándose variaciones hasta de 10 por ciento de transmitancia entre ellos. Se determinó la desviación estándar (Tabla No. 7) de cada grupo de resultados lo que apoyó numéricamente lo antes explicado sobre la gran dispersión de los resultados.

Los resultados de análisis efectuados con cultivos microbianos con un día de crecimiento en el medio de resiembra estuvieron poco dispersos (Tabla No. 7) encontrándose variaciones de $\pm 0.7\%$ de transmitancia entre diferentes muestras correspondientes a una misma solución estándar.

Los resultados se explicaron en función de las diferentes etapas de crecimiento de un cultivo microbiano (II2.C.g). La óptima entrada del antibiótico a la célula ocurre en fase logarítmica que es una de las primeras fases del cultivo microbiano en el medio. Un cultivo de 9 horas posiblemente estuvo en fase de retardo o en transición de fases, mientras que cultivos de 2 y 4 días se encontraron en fases posteriores a la logarítmica, probablemente estacionaria y de decaimiento respectivamente.

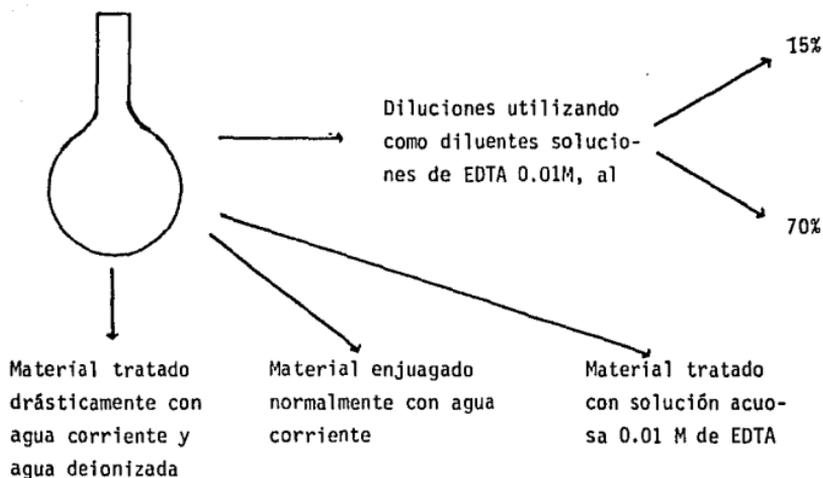
En base a los experimentos anteriores se concluyó que para obtener resultados con el mínimo de dispersión se debe utilizar un cultivo microbiano con un día de previa resiembra.

III.2.D ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA DE RESIDUOS CONTAMINANTES.

La oxitetraciclina y su clorhidrato son susceptibles a

formar complejos con residuos orgánicos e inorgánicos conduciendo a una pérdida de actividad biológica (2); pudiendo provenir dichos residuos del detergente o del agua de lavado.

Para estudiar la influencia de los residuos presentes se hicieron series de análisis siguiendo el modelo que se observa en el Esquema No. 6.



Esquema No. 6. Esquema que muestra los experimentos realizados para estudiar la influencia de los residuos contaminantes presentes en el material.

El desarrollo del experimento consistió en analizar microbiológicamente muestras de clorhidrato de oxitetraciclina utilizando material tratado de 3 distintas maneras y los diluentes ya mencionados. Con este objetivo se preparó una solución inicial del antibiótico en HCl 0.1 N con una concentración aproximada de 1 mg/ml y de ésta, se tomaron las alícuotas correspondientes a los distintos experimentos. En un mismo día se realizaron los 5 experimentos, mismos que fueron realizados en 3 ocasiones manteniendo constantes las variables ya estudiadas.

Considerando las propiedades complejantes del EDTA y para tratar de eliminar las interferencias debidas a residuos orgánicos e inorgánicos se hizo una serie de determinaciones analíticas de clorhidrato de oxitetraciclina materia prima en que el material utilizado se trató previamente con solución acuosa de EDTA 0.01 M aunado a esto, se hicieron series adicionales de determinaciones en las que se incorporó EDTA al diluyente empleándose para este fin soluciones acuosas 0.01 M de EDTA al 15 y 70% (Esquema No. 6).

Los resultados se evaluaron como porcentaje de transmitancia de las muestras. En la Tabla No. 8 se muestran los valores promedio del % de transmitancia de las muestras correspondientes a la curva estándar de referencia de cada grupo de experimentos.

Tabla No. 8. Valores promedio de los resultados (% de T) obtenidos con cada una de las soluciones estándar de los experimentos.

Soluciones estándar de referencia				
A	B	C	D	E
56.01	59.85	62.15	64.23	66.02
55.12	58.04	62.60	65.57	66.85
55.75	56.97	61.30	64.54	65.72

Se compararon los resultados promedio de análisis realizados utilizando material tratado drásticamente con agua corriente y agua deionizada, material enjuagado normalmente con agua corriente y material tratado con solución de EDTA 0.01 M (Tabla No. 9) y se observó que no hubo diferencia significativa entre los valores promedio obtenidos en los distintos grupos de análisis. Se determinaron y compararon los valores de desviación estándar de cada grupo de experimentos y se observó que los resultados tuvieron menor dispersión en el caso de los análisis realizados con material tratado drásticamente.

Tab a No. 9. Tabla que muestra los resultados promedio (% de transmitancia) y sus valores de desviación estándar en el experimento para el estudio de la influencia de residuos contaminantes en el material.

	Material tratado drásticamente	Material enjuagado normalmente	Material tratado con solución 0.01M de EDTA	Diluentes Soluciones de EDTA 0.01 M en agua al	
				15%	70%
	62.42	61.67	62.13	64.17	73.15
	61.85	61.37	62.87	64.12	73.52
	62.02	61.55	62.55	64.80	74.00
Promedio	62.09	61.53	62.51	64.36	73.55
Desv. st	0.362	0.668	0.730	0.755	0.665

Cuando se utilizaron como diluentes soluciones 0.01 M de EDTA en agua al 15% y 70% se observó una ligera disminución del crecimiento microbiano con altas concentraciones de EDTA (menor turbidez, mayor transmitancia) (Tabla No. 9) lo cual indicó que el EDTA tuvo efecto inhibitor del crecimiento microbiano en el medio de cultivo durante el análisis.

Se concluyó que los valores promedio de los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas de clorhidrato de oxitetraciclina no son influenciados por la presencia de residuos, pero si en cuanto a la dispersión (desviación estándar) de los resultados de cada una de las muestras; dicha dispersión se logró mi-

nimizar utilizando material enjuagado drásticamente con agua corriente y agua deionizada.

III.2.E ESTUDIO DE LA SOLUBILIDAD DEL CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA EN LA ELECCION DEL DISOLVENTE.

Para analizar un antibiótico por métodos microbiológicos, es necesario preparar soluciones diluidas del medio, para lo cual se requieren disolventes en los cuales el antibiótico de interés sea totalmente soluble (II.2.C.d).

Con el fin de seleccionar el disolvente más adecuado se estudiaron 3 disolventes los cuales fueron agua deionizada estéril, HCl 0.1 N y solución reguladora de fosfatos 0.1 M pH = 4.5 USP XXI esta solución se seleccionó debido a que el clorhidrato de oxitetraciclina alcanza su mayor estabilidad en solución acuosa a pH 4.5. Se utilizaron 5 soluciones diluidas de antibiótico estándar de referencia y una solución diluida del problema (método 5 + 1) por cada disolvente estudiado y los experimentos se efectuaron 3 veces.

Se determinó la potencia biológica del clorhidrato de oxitetraciclina promediando los resultados (% de transmitancia) de las muestras correspondientes a las soluciones problema e interpolándolos en una relación matemática lineal entre la dosis y la respuesta de las muestras. Los resultados de potencia biológica de clorhidrato de oxitetraciclina se muestran en la Tabla No. 10.

Los resultados de análisis utilizando solución reguladora

de fosfatos 0.1 M, pH = 4.5, y agua deionizada mostraron una gran

Tabla No. 10. Resultados (potencia biológica) obtenidos en el estudio de la elección del disolvente más adecuado.

Análisis	Disolventes utilizados		
	Sol. reguladora de fosfatos pH = 4.5, 0.1 M	Agua deionizada estéril	HCl 0.1 N
1	92.33	85.14	98.61
2	86.52	96.43	99.99
3	95.75	88.62	98.11

dispersión entre ellos mientras que cuando se utilizó HCl 0.1 N la dispersión de los resultados se redujo en gran medida. Se pensó que este problema se debió a que las soluciones que se formaron al disolverlo no fueron siempre homogéneas provocando que las cantidades de antibiótico en las alícuotas no fueran siempre iguales, por lo que las cantidades cuantificadas en forma de su potencia biológica mostraran esa gran dispersión. Cuando se utilizó HCl 0.1 N se superó el problema.

El fenómeno pudo ser explicado en términos de la velocidad de disolución esto es, que cuando se utilizó solución reguladora de fosfatos y agua deionizada, el tiempo empleado fue insuficiente para alcanzar disolver el antibiótico puesto que se disuelve lentamente. Este problema se superó al utilizar HCl 0.1 N en que

la disolución fue más rápida lo que permitió tener alícuotas homogéneas.

Se concluyó que una de las causas de la dispersión de los resultados (potencia biológica de clorhidrato de oxitetraciclina) fue la velocidad de disolución del antibiótico en el disolvente y este problema se superó al disolver la muestra con HCl 0.1 N.

III.3 ESPECIFICIDAD.

Todo método analítico debe ser específico en la determinación del principio activo cuando están presentes los excipientes utilizados en la formulación y/o los productos de degradación de la molécula.

Para probar la especificidad del método al principio activo cuando están presentes excipientes se efectuaron determinaciones analíticas de una formulación de uso veterinario y placebos de oxitetraciclina siguiendo el método estudiado. Los resultados promedio (% de T) de cada caso se muestran en la Tabla No. 10. Las determinaciones se hicieron por duplicado.

Tabla No. 10. Tabla que muestra los resultados de los experimentos realizados para probar la especificidad del método al principio activo en presencia de excipientes.

Soluciones estándar (% de transmitancia)					Forma Farma- céutica	Placebo
A	B	C	D	E		
42.07	45.84	49.07	52.15	54.16	50.47	21.48
40.85	42.23	45.62	47.94	50.84	47.82	20.06

Los resultados se expresaron como promedio de los valores de % de transmitancia y no como potencia biológica. Los experimentos mostraron que no hubo interferencia de los excipientes en las determinaciones ya que en el caso de las formulaciones placebo el crecimiento microbiano fue superior al correspondiente a las otras muestras, lo cual demostró que no hubo detención alguna del crecimiento del microorganismo en el medio de cultivo.

Se concluyó que el método analítico estudiado es específico en la determinación del principio activo cuando están presentes los excipientes de una formulación de uso veterinario.

III.4 VALIDACION.

El método resultante de la optimización de las variables estudiadas fue validado, efectuándose 25 determinaciones analíticas para asegurar mediante pruebas estadísticas, su exactitud, linealidad y precisión. Se prepararon 5 lotes de muestras placebo a las que se les agregó el 50%, 65%, 85%, 100% y 130% respectivamente de clorhidrato de oxitetraciclina. Los resultados se muestran a continuación:

mg adicionados	mg recobrados	% de recobro
5.00	5.32	106.40
5.00	5.17	103.40
5.00	4.81	96.30
5.00	4.79	95.80

mg adicionados	mg recobrados	% de recobro
5.00	4.98	99.60
6.50	6.10	93.85
6.50	6.63	102.06
6.50	6.41	98.61
6.50	6.26	96.31
6.50	6.50	100.00
8.50	8.46	99.53
8.50	8.92	104.94
8.50	8.24	96.94
8.50	8.34	98.12
8.50	8.50	100.00
10.00	9.86	98.60
10.00	9.81	98.11
10.00	9.60	96.00
10.00	10.39	103.90
10.00	10.32	103.20
13.00	12.82	98.61
13.00	13.18	101.38
13.00	13.06	100.46
13.00	13.47	103.61
13.00	13.46	103.55

III.4.A EXACTITUD.

Se determinaron los parámetros característicos considerando los porcentajes de recobro y son los siguientes:

Media	$\bar{x} = 99.95$
Varianza	$s^2 = 10.782$
Desviación estándar	$s = 3.283$
Error estándar	$EE = 0.7269$

Hipótesis

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_a: \mu \neq \mu_0; \mu_0 = 100\%$$

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Estadígrafo de contraste. Comparación de las medias de 2 poblaciones mediante la prueba t de Student.

$$t_{\text{calc}} = -0.3852$$

$$t_{24 \text{ gl}, \alpha: 0.05} = 2.064$$

Considerando que:

$-2.064 < -0.3852 < 2.064$ se acepta H_0 probándose de esta manera la exactitud del método con un nivel de significancia de 0.05%.

$$\text{Intervalo de confianza} \quad IC = 99.95 \pm 1.50$$

$$\text{Límites de confianza} \quad LC = (98.45, 101.45)$$

III.4.B LINEARIDAD.

Con el objeto de probar la linealidad del método se determinaron los siguientes parámetros.

Ordenada de origen	$A = - 0.2215$
Pendiente	$B = 1.0275$
Error típico de Est.	$\hat{S}_{y/x} = 0.2582$

Inferencias acerca de A

Hipótesis

$$H_0: A = A_0$$

$$H_a: A \neq A_0; A_0 = 0$$

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Estadígrafo de contraste: comparación de las medias de 2 poblaciones mediante la prueba t de Student.

$$t_{\text{calc}} = - 1.3076$$

$$t_{23 \text{ gl}, \alpha = 0.05} = 2.069$$

Considerando que:

$$- 2.069 < 1.3076 < 2.069, \text{ se acepta } H_0.$$

Intervalo de confianza $IC = - 0.2215 \pm 0.3452$

Límites de confianza $LC = (- 0.5667, 0.1237)$

Inferencias acerca de B

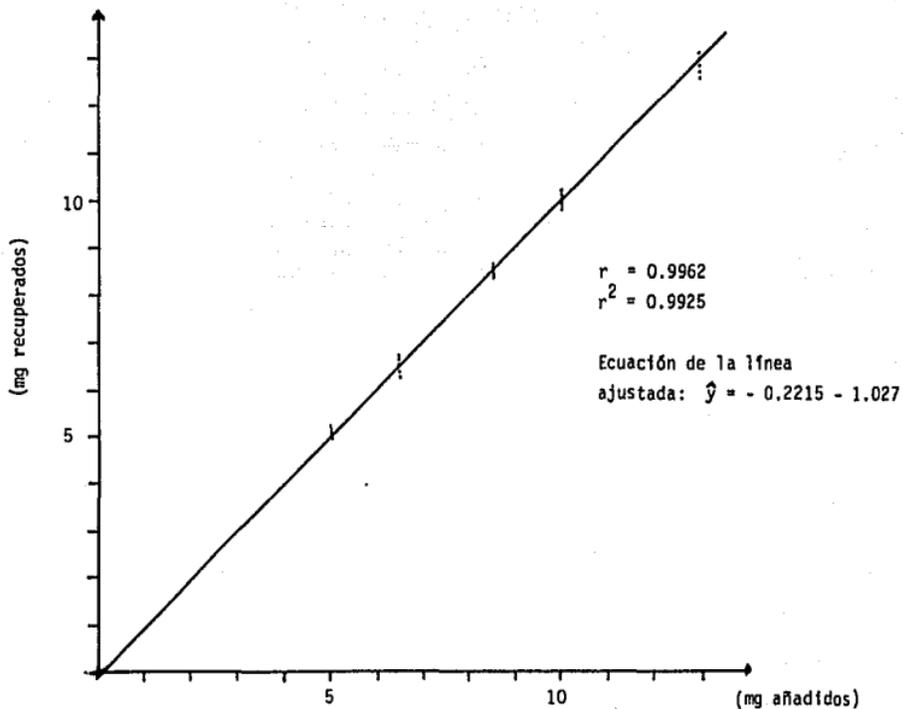
Hipótesis

$$H_0: B = B_0$$

$$H_a: B \neq B_0; B_0 = 1$$

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Estadígrafo de contraste: comparación de las medias de 2 poblaciones mediante la prueba de t Student.



Gráfica No. 15. Gráfica de la linealidad correspondiente a los resultados de validación del método analítico para la cuantificación de clorhidrato de tetraciclina.

$$t_{\text{calc}} = 1.4842$$

$$t_{23 \text{ gl}, \alpha: 0.05} = 2.069$$

Considerando que:

$$- 2.069 < 1.4842 < 2.069, \text{ se acepta } H_0.$$

Intervalo de confianza $IC = 1.0275 \pm 0.0381$

Límites de confianza $LC = (0.9894, 1.0656)$

Ecuación de la línea recta ajustada $\hat{y} = - 0.2215 \pm 1.0275x$

Coefficiente de correlación $r = 0.9962$

Coefficiente de determinación $r^2 = 0.9924$

III.4.C REPETIBILIDAD.

Con base a los porcentajes de recobro se hizo una prueba estadística para evaluar la repetibilidad del método. Se determinaron los siguientes parámetros:

Varianza $s^2 = 10.782$

Desviación estándar $s = 3.283$

Nivel de significancia $\alpha: 0.05$

Hipótesis

$$H_0: \sigma^2 < \sigma_0^2$$

$$H_a: \sigma^2 > \sigma_0^2; \sigma_0^2 (5)^2$$

Estadígrafo de contraste

$$\chi^2_{\text{calc}} = 12.6819$$

$$\chi^2_{24 \text{ gl}, \alpha: 0.05} = 36.415$$

Considerando que:

χ^2_{calc} χ^2_{tab} se acepta H_0 probándose de esta manera la repetibilidad del método.

Límites de confianza LC = (2.838, 5.056)

III.4.D REPRODUCIBILIDAD.

Se evaluó la reproducibilidad del método considerando los días de análisis como factor aleatorio. Se hicieron 6 determinaciones analíticas diferentes; los resultados se muestran en la Tabla No. 11 y se refieren a % de recobro.

Tabla No. 11. Resultados de las determinaciones analíticas de clorhidrato de oxitetraciclina (mg recobrados) realizados en 2 días diferentes.

Análisis	d í a s	
	1	2
1	95.74 (mg)	96.37 (mg)
2	102.06	99.99
3	103.59	100.10

Tabla No. 12. Análisis de varianza de los resultados obtenidos en la evaluación de la reproducibilidad.

ANAEVA

Análisis	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Día	1	4.5808	4.5808	0.3712
Error	4	43.6450	10.9112	

Inferencias

Hipótesis

Ho: $F_{calc} < F_{tab, \alpha}$ 0.05 existe efecto por día

Ha: $F_{calc} > F_{tab, \alpha}$ 0.05 no existe efecto por día

$$F_{calc} = 0.3712$$

$$F_{tab \alpha: 0.05} = 7.7086$$

Considerando que $F_{tab} > F_{calc}$, se concluye que no hubo efecto por el día del análisis. Esto significa que los resultados no se vieron influenciados por efectuar las determinaciones en días diferentes.

III.5 ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL METODO ANALITICO MICROBIOLOGICO EN LA DETERMINACION DE CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA DURANTE EL PROCESO DE SU DEGRADACION.

III.5.A ESTUDIO PRELIMINAR. ANALISIS DE MUESTRAS MONTADAS EN ESTABILIDAD ACELERADA.

Después del estudio de las variables que influyen en el método analítico turbidimétrico, se procedió a estudiar el comportamiento de dicho método en la determinación cuantitativa de clorhidrato de oxitetraciclina cuando además de éste están presentes productos originados en la descomposición química del antibiótico. Para esto se analizaron de acuerdo al método en estudio, muestras conteniendo clorhidrato de oxitetraciclina como principio activo pertenecientes a un mismo lote que habían estado durante 2 años a temperatura ambiente, 45°C y 60°C y cuyos reportes iniciales de potencia biológica fueron en todos los casos 100%, realizando las determinaciones analíticas por triplicado. En base a la observación de las propiedades físicas de las muestras se supuso que las muestras estaban ya en proceso de degradación tanto química como física. A partir de los resultados obtenidos se determinó la potencia biológica de las muestras (Tabla No. 13).

Tabla 13. Resultados (potencia biológica) de los análisis efectuados a muestras conteniendo clorhidrato de oxitetraciclina montadas en condiciones de estabilidad.

Análisis	Condiciones a las que se mantuvieron las muestras		
	T. ambiente	45°C	60°C
1	120.12	107.88	98.46
2	122.90	110.85	94.49
3	118.45	105.91	96.09
Promedio	120.52	108.21	96.35

La velocidad del proceso de degradación de la molécula causada por la temperatura dependió directamente de ésta. De acuerdo a los resultados obtenidos y considerando que el tiempo de almacenamiento en condiciones de estabilidad fue el mismo para todas las muestras, se consideró que las diferentes condiciones de temperatura a las que se mantuvieron las muestras fueron las variables que marcaron las distintas etapas del proceso de degradación de la molécula; ésto es que a medida que la temperatura a la cual se mantuvieron las moléculas aumentó, la velocidad de degradación aumentó, por lo que las muestras mantenidas a 60°C estaban en una fase de degradación más avanzada que las otras y las muestras a temperatura ambiente fueron las que estaban menos degradadas. Por tanto se pensó que la formación de los compuestos con potencia biológica ma-

por a 100 (muestras a temperatura ambiente) ocurrió en una de las primeras fases de la degradación y que conforme avanzó la descomposición los productos muy activos formados anteriormente, se descompusieron dando lugar a otros con menor potencia biológica (muestras a 60°C).

En base a los datos anteriores se cree que en el proceso degradativo de clorhidrato de oxitetraciclina los primeros productos de descomposición formados fueron biológicamente más activos que el antibiótico sin degradar y esta actividad biológica de los productos originados en la descomposición disminuyó conforme avanzó dicho proceso.

III.5.B ESTUDIO DEL METODO ANALITICO TURBIDIMETRICO. ANALISIS DE MUESTRAS DE CLORHIDRATO DE OXITETRACICLINA EN DIFERENTES ETAPAS DEL PROCESO DE DEGRADACION.

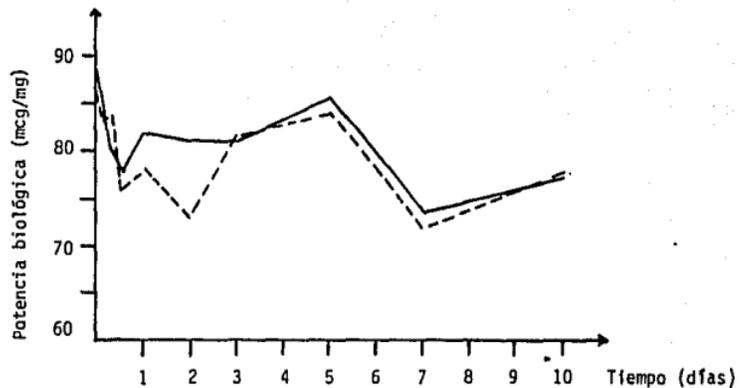
Se hizo un experimento que consistió en analizar muestras conteniendo clorhidrato de oxitetraciclina en diferentes etapas del proceso de degradación. Con este fin se prepararon varios lotes de muestras del antibiótico materia prima y en una forma farmacéutica, y se mantuvieron a 70°C durante distintos períodos de tiempo (Tabla No. 14). Al final de estos períodos, las muestras se analizaron siguiendo el método analítico en estudio, y se determinó la potencia biológica, mismas que se encuentran en la Tabla No. 14. Las determinaciones analíticas se realizaron por duplicado utilizando diferentes muestras montadas bajo condiciones idénticas. Los valo-

res de potencia biológica se graficaron (Gráfica No. 16) y se observó un comportamiento de potencia biológica similar entre el clorhidrato de oxitetraciclina materia prima y forma farmacéutica a lo largo del experimento excepto con las muestras correspondientes a uno y dos días, en que la potencia biológica del antibiótico presente en la forma farmacéutica fue ligeramente menor aproximadamente 3 y 8% respectivamente, que la correspondiente a materia prima (Gráfica No. 16).

Los resultados de potencia biológica del antibiótico durante el proceso de su degradación fueron desconcertantes ya que no se observó que siguiera algún modelo de degradación, sino que se observaron aumentos y decrementos alternados de potencia biológica lo cual podría indicar quizá que durante la degradación aparecieron compuestos con quizá mayor actividad biológica a los 5 días y que posiblemente se degradaron éstos a los 7 días a compuestos probablemente menos activos. Aunado a esto, se determinaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN H^1) de las muestras de clorhidrato de oxitetraciclina materia prima correspondientes al tiempo inicial, 2 y 5 días (espectros anexos). Los espectros de las muestras correspondientes al tiempo inicial y 2 días resultaron exactamente idénticos lo cual indicó que la molécula no sufrió cambio en su estructura entre el inicio del experimento y 2 días después. En el espectro de la muestra correspondiente a los 5 días se observó la aparición de una señal que a través del estudio espectroscópico correspondien-

Tabla No. 14. Tabla de resultados (potencia biológica) de los análisis efectuados a muestras de clorhidrato de oxitetraciclina materia prima y forma farmacéutica, que se mantuvieron a 70°C.

MUESTRAS		TIEMPO QUE PERMANECIERON LAS MUESTRAS A 70°C										
ANALISIS		inicial	3 hrs	6 hrs	12 hrs	1 dfa	2 dfas	3 dfas	5 dfas	7 dfas	10 dfas	
Clorhidrato de oxitetraciclina	Materia prima	1	90.42	83.04	81.15	75.84	83.02	83.28	82.52	84.64	72.02	78.10
		2	87.52	86.74	81.23	80.00	80.43	79.20	79.98	86.53	74.57	77.07
		Promedio	88.98	84.89	81.19	77.92	81.71	81.24	81.27	85.58	73.71	77.58
	Forma farmacéutica	1	87.12	83.63	82.00	76.43	76.07	73.06	81.45	87.98	73.60	76.42
		2	85.82	82.69	85.18	75.61	80.43	73.16	82.17	80.10	70.52	79.88
		Promedio	86.50	83.16	83.69	76.02	78.25	73.10	81.81	84.01	72.06	78.15



Gráfica No. 16. Resultados (potencia biológica) de los análisis de clorhidrato de oxitetraciclina materia prima y forma farmacéutica, durante el proceso de su degradación a 70° C

Clorhidato de oxitetraciclina
 ————— materia prima
 - - - - - forma farmacéutica

PART NO. 840779-01

PRINTED IN U.S.A.

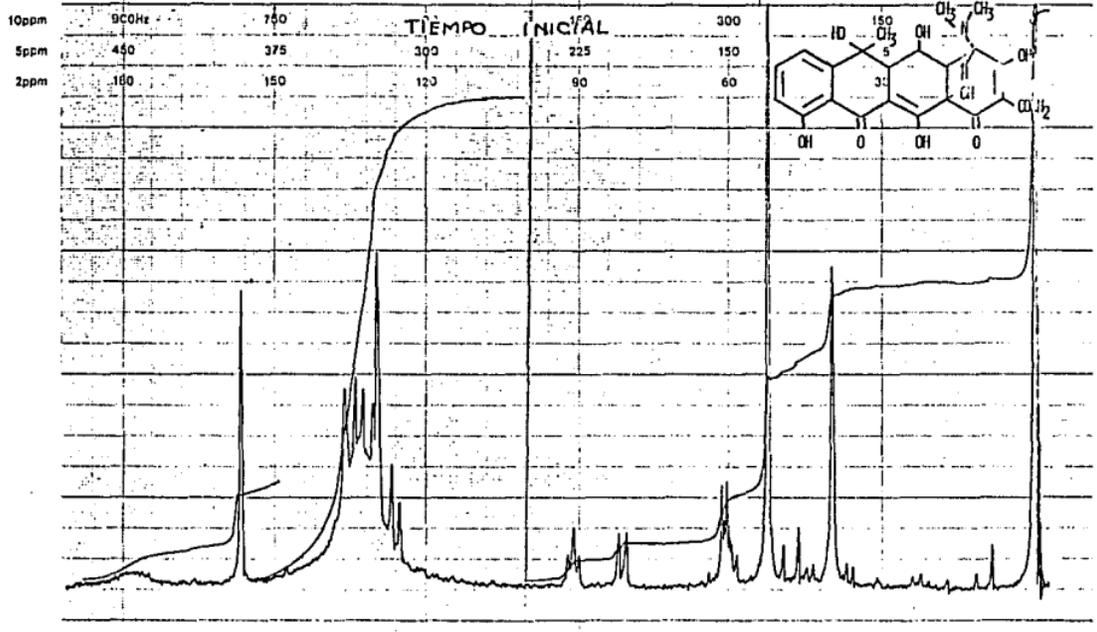


varian instrument division

palo alto, california

ESPECTRO RMN H¹ DE OTC·HCl

E.ID OF S.-Eer



LOCK POS. _____ SWEEP TIME 5 NUCLEI _____ SAMPLE DIFAZ OPERATOR *maas*

LOCK POWER _____ FILTER _____ SWEET WIDTH 0 NUCLEI THIS *Polen* DATE *1/10/69*

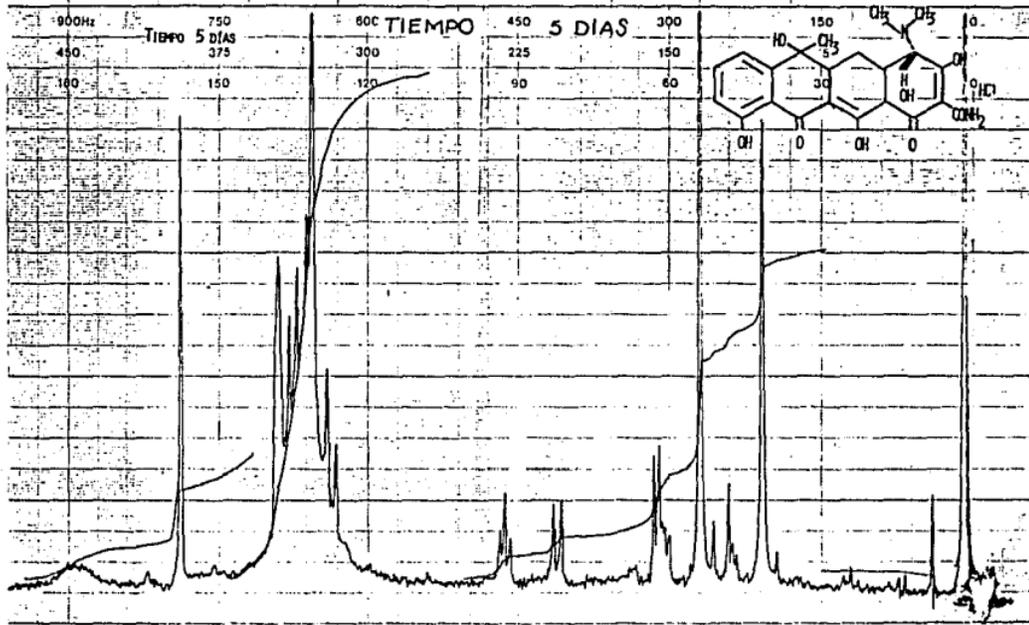
DECOUPLE FUS. _____ DECOUPLING POWER _____ END OF SWEEP 0 SAMPLE TEMP *Analy* SPECTRO. I.D. *19094*

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

START OF SWEEP

ESPECTRO RMN H¹ DE OTC·HCl

END OF SWEEP

10ppm
5ppm
2ppm

ppm (τ)

LOCK FOS. _____	ppm	SPECTROM. AMP	SWEEP TIME	5	NUCLEUS	SAMPLE	OPERATOR	2001
LOCK POWER _____	dB	FILTER	SWEEP WIDTH	10	CONC. OF	100	ATE	1/18/67
DECOUPLE FOS _____	ppm	RF POWER	END OF SWEEP	0	SAMPLE TEMP.	amb	SOLVENT	H ₂ O
DECOUPLING POWER _____	dB						SPECTROM. NO.	19699

INSTRUMENTS IN U.S.A.

PART NO. 85000-01



varian instrument division

palo alto, california

EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

te indicó la ausencia del grupo hidroxilo en posición 5 (Figura No. 2). Esto indicó la aparición de un compuesto que no se reporta como producto de descomposición: la tetraciclina.

IV. RESULTADOS FINALES.

Después de haber efectuado el estudio de variables, el mé todo quedó establecido de la siguiente manera:

IV.1 METODO ANALITICO.

IV.1.A EQUIPO Y REACTIVOS.

- Espectrofotómetro Beckman DU-8 UV Visible o equivalente.
- Agitador mecánico Super mixer Lab line Inst.
- Tina con termostato.
- Aparato de ultrasonido.
- Clorhidrato de oxitetracilina estándar de referencia.
- Solución acuosa de formaldehído al 12%.
- Medio para Antibióticos No. 1.
- Medio para Antibióticos No. 3.

Usar medio para Antibióticos No. 1 para mantener al micro organismo de prueba y el Medio para Antibióticos No. 3 como medio líquido de previo crecimiento y como medio de prueba.

IV.1.B PROCEDIMIENTO.

Previo al análisis todo el material a utilizar debe ser enjuagado drásticamente tanto con agua corriente como con agua deionizada, por lo menos 10 veces con cada una. Proteger el material de la luz.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES CORRESPONDIENTES A LA CURVA ESTANDAR.

En un matraz volumétrico de 50 ml pesar exactamente alrededor de 10 mg de clorhidrato de oxitetraciclina estándar de referencia, disolver con solución 0.1 N de HCl, llevar a volumen con esta solución, transferir una alícuota de 1 ml a un matraz volumétrico de 200 ml, llevar a volumen con agua deionizada estéril, mezclar y transferir a matraces volumétricos de 10 ml, alícuotas de 1, 2, 3, 4 y 5 ml respectivamente, llevar al aforo con agua deionizada estéril. Las concentraciones finales son: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 microgramos por mililitro respectivamente correspondientes a los puntos A, B, C, D y E de la curva estándar.

PREPARACION DE LA SOLUCION PROBLEMA.

Pesar exactamente una cantidad equivalente a 10 mg de clorhidrato de oxitetraciclina en un matraz volumétrico de 50 ml, disolver con solución 0.1 N de HCl y llevar a volumen con la misma solución, de ésta transferir una alícuota de 1 ml a un matraz volumétrico de 200 ml, llevar a volumen con agua deionizada estéril. Mezclar y transferir una alícuota de 3 ml a un matraz volumétrico de 10 ml, llevar al aforo con agua deionizada estéril y mezclar. Concentración final 0.3 microgramos por mililitro.

PREPARACION DE MICROORGANISMO DE PRUEBA.

El microorganismo de prueba Staphylococcus aureus ATCC 6538-P se mantiene a 5°C resemebrándolo cada 2 semanas. Dos días

antes del análisis, resembrar el microorganismo en tubos inclinados conteniendo Medio para Antibióticos No. 1 e incubar a 37°C, 24 horas después inocular 50 ml de Medio Antibióticos No. 3 (Medio líquido de previo crecimiento) con el cultivo microbiano resembrado 24 horas antes.

El día del análisis ajustar la concentración de un volumen de Medio No. 3 (Medio de prueba) a 85% de transmitancia con la suspensión microbiana en el Medio líquido previo crecimiento contra un blanco constituido por Medio No. 3 estéril. El ajuste se hace a 650 nm.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Dividir los tubos de ensayo en series de 4 tubos cada una, colocar 1 ml de la solución correspondiente a cada punto del estándar y del problema en cada serie de tubos. En 3 tubos diferentes, colocar 1 ml de agua deionizada estéril, 2 tubos blancos y un tubo testigo. Agregar 9 ml de Medio de prueba sin inocular a cada tubo blanco y aleatoriamente adicionar 9 ml de Medio de prueba inculado a los tubos conteniendo las soluciones problema y estándar, mezclar vigorosamente e incubar a 37°C durante 2:30 horas. Al final de este tiempo colocar los tubos en un baño con agua helada y agregar a cada tubo 1 ml de solución acuosa de formaldehído al 12%. Mezclar vigorosamente y determinar espectrofotométricamente a 530 nm la turbidez de la suspensión medida como % de transmitancia en cada tubo, comparándolas con la turbidez del tubo blanco.

IV.1.C CALCULOS.

Promediar los valores de % de transmitancia de cada punto de la curva estándar y del problema e interpolar éste en una relación matemática lineal ajustada por el método de mínimos cuadrados, entre los valores promedio de % de transmitancia de cada punto de la curva estándar y el logaritmo de la concentración de cada una de dichas soluciones. Calcular el antilogaritmo del valor de la concentración obtenida en la interpolación y para conocer el % de oxitetraciclina clorhidrato presente en la muestra utilizar la siguiente relación:

$$\text{Conc} * \frac{10}{3} * \frac{200}{1} * \frac{50}{W} * \frac{100}{1000} * \frac{1}{\%}$$

donde:

Conc se refiere al antilogaritmo del valor obtenido en la interpolación (mcg/ml)

W es el peso de la muestra (mg)

% es el porcentaje teórico de oxitetraciclina como clorhidrato en la formulación.

V. CONCLUSIONES.

Se concluye que:

- De acuerdo al estudio de variables efectuado, la concentración de la suspensión microbiana en el medio de prueba, el tiempo de crecimiento en el medio líquido previo al análisis y el tiempo de incubación del medio de prueba, interaccionaron en gran medida modificando las relaciones gráficas dosis respuesta de los resultados obtenidos.

- Se observó que al realizar el análisis con concentraciones bajas de células microbianas en el medio de prueba, las curvas de las relaciones dosis respuesta no estuvieron definidas, además presentaron pendientes muy pequeñas debido a que la población fue controlada muy fácilmente por el antibiótico. Dicha pendiente aumentó conforme aumentó la concentración de la suspensión microbiana hasta un nivel de 85% de transmitancia, pero al seguir aumentando la concentración, se observó que la pendiente de las curvas disminuyó.

- Las curvas dosis respuesta se definieron mejor conforme disminuyó el tiempo de previo crecimiento. La pendiente aumentó conforme disminuyó el tiempo de previo crecimiento del microorganismo en el medio líquido debido a que cultivos microbianos con más de un día de previo crecimiento, se encontraron posiblemente en fases de crecimiento estacionaria y/o de decaimiento.

- El tiempo de incubación también fue un factor influyente en la forma de la relación dosis respuesta. Las relaciones obte-

nidas una hora después de iniciar el período no estuvieron bien definidas debido a que probablemente el microorganismo estaba todavía en fase de adaptación al medio de prueba, por lo que las mejores relaciones se obtuvieron 2.30 horas después de haber iniciado el período de incubación.

- La dispersión entre resultados correspondientes al mismo tratamiento no se vió afectada por los cambios de las diferentes variables.

- Las condiciones metodológicas del estudio de variables quedaron establecidas de la siguiente manera:

La concentración de células microbianas (turbidez) del medio de prueba debe ajustarse espectrofotométricamente a 650 nm a 85% de transmitancia a partir de un cultivo de S. aureus ATCC 6538-P con un día de previo crecimiento en el medio líquido, e incubar las muestras durante un período de 2:30 horas a 37°C.

- El medio de cultivo líquido de previo crecimiento debe ser inoculado con un cultivo microbiano de 24 horas de crecimiento en el medio de resiembra. Cultivos más jóvenes o más viejos se encontraron posiblemente en fases de crecimiento diferentes o quizá, en transición de fases, dificultando la entrada del antibiótico a la célula debida a cambios fisiológicos en ésta, lo que originó que las células microbianas no tuvieran las mismas características morfológicas obteniéndose así, resultados erróneos debido a que la entrada del antibiótico a las células no ocurrió de manera homogénea.

- Iones metálicos, aniones, partículas provenientes del agua de lavado o del detergente, no interfirieron en la determinación analítica de clorhidrato de oxitetraciclina pero si influenciaron en la dispersión de los resultados. Soluciones acuosas de EDTA en concentraciones altas ejercieron un efecto inhibitor del crecimiento bacteriano. Para eliminar la influencia en la dispersión de dichos iones y partículas, el material se trató drásticamente con agua corriente y agua deionizada por lo menos 10 veces con cada una, para asegurar la ausencia de las partículas contaminantes.

- El clorhidrato de oxitetraciclina presentó problemas en la velocidad de disolución en solución reguladora de fosfatos pH = 4.5 0.1 M y en agua deionizada, arrojando resultados muy variables. Cuando se utilizó HCl 0.1 N como disolvente la velocidad de disolución se incrementó, lo que condujo a la obtención de resultados con un mínimo de dispersión.

- El método estudiado resultó específico en la determinación de clorhidrato de oxitetraciclina cuando están presentes excipientes de una forma farmacéutica ya que no se observó la interferencia de éstos en las determinaciones analíticas.

- El método microbiológico turbidimétrico estudiado en este trabajo resultó no específico en la determinación del antibiótico cuando están presentes productos originados en su descomposición confirmando la información bibliográfica a este respecto (26). Esto se observó al analizar muestras de clorhidrato de oxitetra-

riciclina mantenidas bajo condiciones de estabilidad y observar la interferencia de los productos de descomposición en los resultados, mostrando en la mayoría de los casos una actividad biológica mayor al 100%.

- En la certificación de la funcionalidad del método analítico fueron analizados 5 diferentes lotes de muestras placebo a las que se les adicionaron diferentes cantidades de clorhidrato de oxitetraciclina correspondientes al 50%, 65%, 85%, 100% y 130%. Con un nivel de significancia del 5%, el método resulto ser exacto, lineal y preciso, considerando en la reproducibilidad únicamente los días en que se realizaron los análisis como factor aleatorio.

- Se analizaron muestras de clorhidrato de oxitetraciclina materia prima y en una forma farmacéutica, en diferentes etapas del proceso de degradación acelerada (muestras a temperatura ambiente a 45°C y a 60°C). Se supuso que los productos formados en las primeras fases del proceso fueron los más activos biológicamente. Conforme avanzó la degradación, la actividad biológica disminuyó. En un estudio del proceso degradativo, se analizaron muestras del antibiótico que habían estado a 70°C durante distintos períodos de tiempo y se observó un comportamiento del proceso que no pudo ser explicado, mediante espectroscopía de RMN ^1H se determino la formación de un compuesto, la tetraciclina.

VI. BIBLIOGRAFIA.

1. United States Pharmacopoeia. XXI Ed. 1985.
2. Osol A. y Pratt R. The United States Dispensatory. Lippincott Co. 27th Ed., Philadelphia.
3. Merck Index. 9th Ed. Merck & Co.
4. Hochstein F.A., Stephens, C.R., Conover, L.H., Regna P.R., Pasternack R., Gadon P.M. y Pilgrim F.J. J. Am. Chem. Soc. 75, 5455 (1953).
5. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 28th Ed. The Pharmaceutical Press. London 1982.
6. Mc Cormick J.R., Fox S.M., Smith L.L., Bitler B.A., Reichentel L., Origani V.F., Muller W.H., Winterbottom R. y Doerschuck A.P. J. Am. Chem. Soc., 79, 2849 (1957).
7. Hughes D.W. y Wilson W.L. Can. J. Pharm. Sci. 8, 67 (1973).
8. Gans E.H. y Higuchi T.J. J. Am. Pharm. Ass. Sci. Ed. 46, 458 (1957).
9. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Edit. Médica Panamericana, 6a. Ed. Buenos Aires.
10. USP DI Drug information for health care providers. Medical Economic Books. (1984).
11. British Pharmacopoeia. (1980).

12. British Pharmacopoeia. (1973).
13. Bailey F. J. Pharm. Pharmac. 21, 415 (1969).
14. Ragazzi E. y Veronese G. J. Chromatogr. 132, 105 (1977).
15. Alvarez A., Torre V. y Sánchez E. J. Pharm. Sci. 58, 443 (1969).
16. Gyanchandani N., Mc Gilveray y Hughes D.W. J. Pharm. Sci. 59, 225 (1975).
17. Szabó A., Kóvacs M. y Tomorkeny E. J. Chromatogr. 151, 256 (1978).
18. Ragazzi E. y Veronese G. J. Chromatogr. 134, 223 (1977).
19. Sina A., Youssef M., Kassem A. y Atica A. J. Pharm. Sci. 60, 1544 (1971).
20. Tsuji K y Roberston J. J. Pharm. Sci., 65, 400 (1976).
21. Mack G. y Ashworth R. J. Chromatogr. Sci., 16, 93 (1978).
22. Mourot D., DÉléphine J. Boisseau J. y Goyot G. J. Chromatogr. 190, 486 (1980).
23. Athanikar H., Jurgens R., Sturgeon R. y Zober L. J. Parenteral Sci. and Techn., 37, 125 (1983).
24. Tsuji K. y Roberston J. Anal. Chem., 45, 2136 (1973).
25. Hewitt W. Microbiological Assay. Academic Press, (1977).

26. Kavanagh F. Analytical Microbiology, Vol. II. (1972).
27. Pelczar M., Reid R. y Chan E. Microbiología. 4a. Ed. Edit. Mc Graw Hill. México, (1973).
28. Hayslett H.T. Estadística Simplificada. Edit. Minerva. (1978).
29. Ostle H. Estadística Aplicada. Edit. Limusa, México, (1982).
30. Kreyszig E. Introducción a la estadística matemática. Edit. Limusa. (1981).