

Lej. 17

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



DETERMINACION DE MIDECAMICINA POR METODOS QUIMICOS Y MICROBIOLÓGICOS: EN CAPSULAS Y SUSPENSION ORAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A

MARTHA LLANETT CAÑAS LOPEZ

MEXICO, D. F.

1987



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

- 1. Introducción**
- 2. Generalidades**
 - 2.1 Midecamicyna**
 - 2.2 Especificaciones**
 - 2.3 Método químico**
 - 2.4 Método Microbiológico**
- 3. Parte Experimental**
 - 3.1 Materia prima**
 - 3.2 Cápsulas**
 - 3.2 Polvo para reconstituir**
 - 3.3 Resultados**
- 4. Análisis de Resultados**
- 5. Conclusiones**
- 6. Bibliografía**

1. INTRODUCCION

El objetivo de este estudio, es el de aplicar el método químico o microbiológico más adecuado para determinar MIDECAMICYNA, así como determinar la estabilidad de este medicamento tanto en cápsulas como en suspensión. La MIDECAMICYNA es un antibiótico que fue producido en Japón por MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

El interés de comercializar en México este antibiótico, se deriva de ser éste de amplio espectro y actuar contra microorganismos resistentes a otros antibióticos, y no inducir resistencia aún, en concentraciones altas y prolongadas. Se aplica el método de titulaciones no acuosas, utilizando solución 0.1N de ácido perclórico y en la determinación de actividad antimicrobiana se comparó el método de difusión en placa por penicilíndros y sensidiscos.

En el desarrollo galénico, las formas farmacéuticas que se sugieren para el estudio fueron: Cápsulas y polvo para reconstruir.

2. GENERALIDADES DE ANTIBIOTICOS

Se ha dado el nombre de antibióticos a ciertos compuestos o sustancias químicas, que resultan del metabolismo de las células vivas y tienen la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o de destruir bacterias y otros microorganismos; esta definición es válida aun cuando existen antibióticos que son producidos por síntesis, pues inicialmente estas drogas se han aislado de microorganismos.

En 1889 Vuillermin usaba la expresión antibiosis para designar "La lucha entre los seres vivos por la supervivencia". Ward la utilizó también para referirse al antagonismo microbiano. Mas fue en 1945 cuando Waksman, que había descubierto un año antes la estreptomocina, propuso el término antibiótico para "sustancias dotadas de actividad antimicrobiana y extraídas de estructuras vivientes".

En ese mismo año, el premio Nobel de Fisiología y Medicina, fue compartido por Alexander Fleming, Howard Florey y Ernst Chain. Los tres científicos que habían puesto la penicilina a disposición de la humanidad.

Es necesario distinguir entre un antibiótico y un quimiote-

rapéutico.

El antibiótico proviene de un ser vivo, el quimioterapéutico en cambio, se produce abióticamente en un laboratorio. Pero el avance tecnológico y químico, ha permitido la posibilidad de preparar sintéticamente estos compuestos, partiendo de bases químicas puras, desvirtuando el valor de su origen, para denominarlos como antibióticos o quimioterapéuticos.

Para emplearse como quimioterapéutico una substancia, debe poseer las siguientes características:

- a) Debe poseer baja toxicidad para las células hospederas, o sea, que debe destruir o prevenir la actividad del organismo patógeno sin dañar a las células del hospedero o causando un daño mínimo.
- b) Debe entrar en contacto con el organismo patógeno penetrando en las células y difundiéndose en los tejidos del hospedero en concentración eficaz.
- c) No debe interferir en los mecanismos naturales de defensa del hospedero, como la fagocitosis y la formación de anticuerpos.

La palabra antibiótico designa el producto metabólico de un

organismo que es perjudicial o inhibitorio para otros microorganismos en muy pequeñas cantidades.

Propiedades de un antibiótico eficaz.

Todo antibiótico, para ser verdaderamente efectivo, debe poseer las propiedades antes mencionadas para un buen quimioterapéutico y además las siguientes:

1. Destruir o inhibir muchas especies diferentes de microorganismos. Lo que se denomina "Antibiótico de amplio espectro".
2. Dificultar la producción de formas resistentes.
3. No producir efectos secundarios desagradables, como reacciones alérgicas, lesiones nerviosas, irritaciones renales y gastrointestinales.
4. No debe modificar o destruir la flora bacteriana normal del hospedero, porque al modificar el equilibrio natural, podría permitir que los microbios que normalmente no son patógenos o patógenos facultativos que están reprimidos por la flora habitual, establecieran una nueva infección.

Aunque la penicilina descubierta por Sir Alexander Fleming sigue siendo uno de los antibióticos más eficaces, continúa la búsqueda de nuevos antibióticos.

Podrían tener más amplio espectro de acción, menos toxicidad, mayor estabilidad, o una actividad más duradera.

Entre los mejores se encuentran aquellos que atacan a gérmenes patógenos que no responden al tratamiento por penicilinas o que desarrollan resistencia a este antibiótico.

Si bien los antibióticos de amplio espectro son muy valiosos, los que poseen actividad contra grupos específicos, conocidos también como antibióticos de espectro reducido son armas sumamente importantes para la medicina.

Los antibióticos más conocidos y más eficaces hasta ahora, se producen por tres géneros de microorganismos;

Bacillus, Penicillium y Streptomices, todos los cuales se encuentran naturalmente en el suelo y en gran abundancia.

El suelo se ha estudiado extensamente, investigando la existencia de microbios capaces de producir nuevos antibióticos.

La eficacia de los antibióticos, desde el punto de vista te-

rapéutico, se comprueba por la inhibición que efectúa sobre microorganismos específicos bajo condiciones especiales.

Cambios sutiles debidos a la disminución de la actividad antimicrobiana se pueden demostrar mediante valoraciones microbiológicas, utilizando cultivos tipo; para dicha valoración se emplean dos métodos generales:

El de cilindro - placa y el Turbidimétrico.

El primero se basa en la difusión del antibiótico desde un cilindro vertical sobre una placa de agar solidificado, que tiene el germen de prueba, depositado sobre una caja de Petri.

La zona de inhibición prevista del microorganismo, es un área circular que queda alrededor del cilindro que contiene la solución del antibiótico.

El segundo se basa en el desarrollo de un cultivo microbiano en un medio líquido que contiene una solución uniforme del antibiótico; dicho medio favorece el rápido desarrollo microbiano en ausencia del antibiótico.

El método microbiológico de difusión en placa de agar, es el método seleccionado para el presente trabajo. Se ha selec-

cionado este tipo de análisis por la gran sensibilidad que presenta, así como considerarse el más confiable.

La valoración fue realizada por dos variantes del mismo método, sensidiscos de papel filtro y cilindros de acero inoxidable o penicilindros.

Mecanismos de reacción de los antibióticos. Estas sustancias antibacterianas para producir su acción bacteriostática y bactericida, lo hacen interfiriendo con los mecanismos fisiológicos bacterianos. Son cuatro los mecanismos de acción de los antibióticos, como se expresa a continuación.

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular. El componente esencial de dicha pared es un mucopéptido, cuya síntesis es impedida por el antibiótico por inhibición de los sistemas enzimáticos correspondientes; la droga se fija en la pared celular y cuando se produce la división de la bacteria, aparecen defectos en dicha pared, el microorganismo se hace osmóticamente sensible, penetra líquido en su interior, estalla y se lisa. Es así que actúan las penicilinas, cefalosporina, bacitracina y cicloserina.
2. Lisis de la membrana celular. En esta forma se afectan importantes funciones celulares, pues en la membrana

existen sistemas enzimáticos vitales y además rige la entrada y salida de los elementos nutritivos. La polimixina B, colistina, nistatina y anfotericina B actúan de este modo.

3. Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos. No es necesario referirse a la importancia de un trastorno de la síntesis de los ácidos nucleicos, especialmente el ácido desoxirribonucleico, componentes esenciales de las nucleo-proteínas; los antibióticos pueden actuar inhibiendo dicha síntesis. Ejemplo: la griseofulvina.
4. Inhibición de la síntesis proteica. Algunos antibióticos bloquean los pasos necesarios para dicha síntesis, actuando sobre los ribosomas; en esta forma la vida de la bacteria queda afectada, ejemplo: cloranfenicol, lincomicina, eritromicina, etc.

CLASIFICACION DE LOS ANTIBIOTICOS SEGUN SU UTILIDAD TERAPEUTICA.

- I. Llámese antibiótico de espectro reducido, a los que tienen actividad antimicrobiana sobre pocos grupos de gérmenes, abarcando un número relativamente pequeño de especies de microorganismos; son predominantemente bacte-

ricidas.

- II. Los antibióticos de amplio espectro, son aquellos que poseen actividad antimicrobiana sobre múltiples grupos de gérmenes abarcando un gran número de especies de los mismos; son predominantemente bacteriostáticos.

En la primera clase de los antibióticos de espectro reducido se tienen en primer término los más importantes, a saber, las penicilinas y las cefalosporinas, que se agrupan por su estructura química en los antibióticos beta-lactámicos por poseer dicho anillo químico. También es importante la estreptomycinina, que es un antibiótico aminoglucósido. Existen además, antibióticos de espectro reducido que son azúcares complejos lincomicina y la clindamicina. Además algunos antibióticos son químicamente polipéptidos ejemplo; polimixina, colistina, bacitracina, tirotricina y otros con estructura cíclica especial, como las rifamicinas.

Como pudo observarse, los antibióticos de espectro reducido son muy numerosos, a la inversa de lo que sucede con los antibióticos de amplio espectro, que comprenden las tetraciclinas, el cloranfenicol con sus análogos, así como los "macrólidos", que químicamente poseen un anillo lactónico grande, ejemplo; eritromicina, oleandomicina, espiramicina y un grupo nuevo, los peptólidos actualmente denominados

Depsipéptidos que son a la vez, macrólidos y polipéptidos, a saber la virginiamicina.

I. Antibióticos de espectro reducido.

1. Antibióticos beta-Lactámicos. Estructura química: las distintas sustancias de este grupo poseen todas un núcleo químico común, el ácido penicilámico, que tienen un sistema anular formado por la unión de un anillo beta-lactónico tetragonal y uno pentagonal de tiazolidina; el primero constituye una estructura única de esos antibióticos.

2. Cefalosporinas: entre los antibióticos beta-lactámicos, se encuentran las cefalosporinas. Estructura química: Las cefalosporinas derivan de un núcleo común, el ácido cefalosporánico, sistema anular semejante al del ácido penicilámico con su anillo beta-lactámico y con la diferencia que en vez del anillo pentagonal de tiazolidina, el ácido cefalosporánico posee uno hexagonal de dihidrotiazina.

3. Antibióticos aminoglucósidos. Con este nombre se describen antibióticos que como su nombre lo indica, son glucósidos que contienen dos o tres moléculas de azúcares que llevan grupos amínicos; son estreptomina, ka-

namicina, neomicina, gentamicina, paromomicina y aminocidina.

4. Antibióticos azúcares complejos: lincomicina y clindamicina.
5. Antibióticos polipeptídicos son todos estos antibióticos: péptidos o polipéptidos cíclicos a saber: la polimixina, polistina, bacitracina y tirotricina.
6. Rifamicinas. Desde el punto de vista químico, las rifamicinas derivan del dihidroxinaftaleno unido a una larga cadena alifática que lo rodea formando un puente; poseen un carácter ácido.
7. Aminociclitolos. La espectinomicina su estructura es tricíclica; posee grupos amínicos básicos.

ANTIBIOTICOS DE AMPLIO ESPECTRO.

1. Antibióticos de amplio espectro las tetraciclinas. Químicamente, las tetraciclinas tienen un parentesco muy estrecho y derivan de un sistema anular formado por cuatro anillos, el naftaleno, o mejor dicho, el hidrocarburo octahidronaftaleno, de donde deriva a su vez, el núcleo de tetraciclinas.
2. Cloranfenicol y análogos; químicamente el cloranfenicol es singular por poseer un grupo aromático (nitrobenceno) tratándose pues, de un antibiótico nitrado; el cloranfenicol posee además, una cadena lateral alifática derivada del propanodiol que poseen a su vez un grupo dicloroacetamido, debiéndose las propiedades antimicrobianas a dicha cadena lateral, desde luego unida al radical aromático.
3. Macrólidos; antibióticos de amplio espectro, el término macrólido designa una serie de antibióticos que se caracterizan químicamente por poseer un anillo lactónico sumamente grande macrocíclico en su estructura; ejemplo: eritromicina, oleandomicina y espiramicina. Desde el punto de vista químico, los macrólidos, como se ha dicho, poseen un amplio anillo lactónico, macrocíclico, se trata en realidad de un glucósido en que dicha lactona-

glucona, está unida a dos azúcares, uno de los cuales por lo menos es un amino azúcar. Es digna de mencionarse la acción de los macrólidos sobre los estafilococos, aunque sean resistentes a otros antibióticos.

Mecanismo de acción.- El mecanismo de acción antimicrobiana, consiste en inhibir la síntesis protéica al unirse con los ribosomas, impidiendo la acción del ácido ribonucleico mensajero.

Intoxicación.- Salvo circunstancias especiales, los macrólidos son antibióticos muy poco tóxicos.

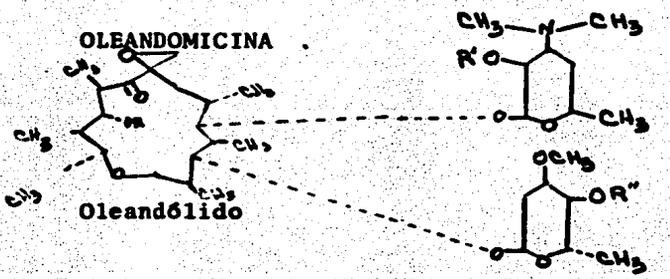
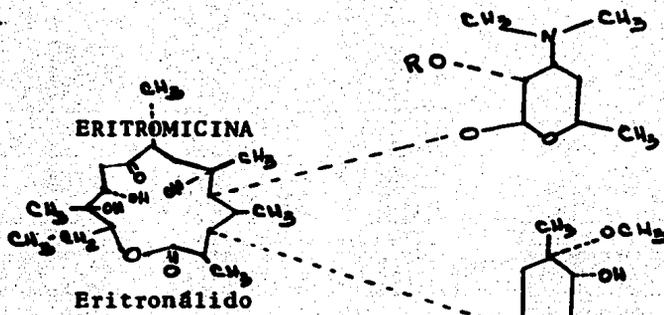
Valoración biológica.- Los macrólicos se valoran generalmente por métodos microbiológicos, en comparación con la actividad antimicrobiana de un preparado patrón.

II. Depsipeptidos o Peptólidos (la virginiamicina). Los antibióticos macrocíclicos son de tres tipos:

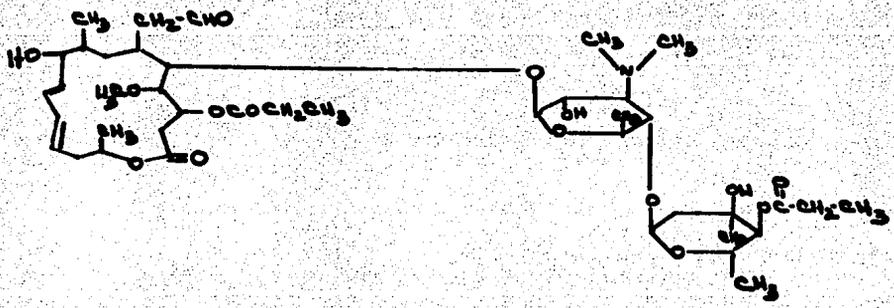
- a) Los macrólidos, formados por un anillo cerrado por un átomo de oxígeno.
- b) Los polipeptídicos, macrocíclicos formados por aminoácidos y el anillo cerrado por átomos de nitrógeno.
- c) Los depsipeptidos o peptólidos con parentesco a la vez con los macrólidos y los péptidos, cuyo anillo macrocíclico se encuentra cerrado por átomos de nitrógeno y oxígeno. A este último grupo corresponde la Virginiamicina.

Como podemos observar, la estructura de la MIDECAMICYNA, nos dice que es un macrólido y como tal, posee un amplio espectro de acción, además, posee la cualidad de actuar ante microorganismos resistentes a otros antibióticos, así como también baja toxicidad.

ESTRUCTURA QUIMICA



MIDECAMICYNA



2.1 GENERALIDADES DE MIDECAMICYNA

La MIDECAMICYNA desarrollada en Japón, por los laboratorios "Meiji Seika, Ltd.", es un nuevo antibiótico producido por *Streptomyces Mycarofaciens* nov. sp.

Espectro antimicrobiológico; la susceptibilidad de varios microorganismos a la MIDECAMICYNA, es mostrada en la tabla siguiente. En esta tabla, podemos apreciar que la MIDECAMICYNA ostenta una vigorosa actividad antibacteriana; esta actividad es muy amplia, abarca desde organismos gram-positivos, algunos organismos gram-negativos, cocos y bacilos (tal como bacilo pertussis). El espectro antibacteriano de la MIDECAMICYNA es similar al de la leucomicina. Casi todos los organismos del grupo de los bacilos gram-negativos son insensibles.

ESPECTRO ANTIMICROBIOLÓGICO

	ORGANISMOS	MIC (mcg./ml.)
GRAM - POSITIVOS	<i>Staphilococcus aureus</i> 209-P	0.78
	<i>Staphilococcus aureus</i> Smith	0.78
	<i>Staphilococcus albus</i> PCI 1200A	3.12
	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cook	0.19
	<i>Streptococcus pyogenes</i> D-58	0.39
	<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC8043	6.25
	<i>Diplococcus pneumoniae</i> I	0.19
	<i>Diplococcus pneumoniae</i> III	0.09
	<i>Sarcina lutea</i>	0.09
	<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	1.56
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1.56
	<i>Bacillus anthracis</i> No. 119	0.78
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0.39
	GRAM - NEGATIVOS	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> Megurida
<i>Neisseria meningitidis</i> i3i02 grupo C		0.78
<i>Escherichia Coli</i> communis		100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		100
<i>Proteus vulgaris</i> OX 19		100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IAM 1007		100
<i>Salmonella</i> Typhi T58		100
<i>Shigella Flexneri</i> 2a		100
<i>Mycoplasma penunoniae</i>		0.0078

EFFECTO DEL pH: Observando los datos de la tabla que presentaremos a continuación, podemos decir que la actividad antibacteriana de la MIDECAMICYNA, baja cuando se encuentra en un pH de 5 a 6, y es óptima en un pH de 8 a 9. Similares efectos se han observado para la Leucomicina.

EFFECTO DEL pH EN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIOLÓGICA
DE LA MIDECAMICYNA Y LEUCOMICINA

pH	MIC (mcg./ml.)	
	MIDECAMICYN	LEUCOMICINA
5.0	3.12	3.12
6.0	1.56	1.56
7.0	0.78	0.79
8.0	0.19	0.39
9.0	0.19	0.19

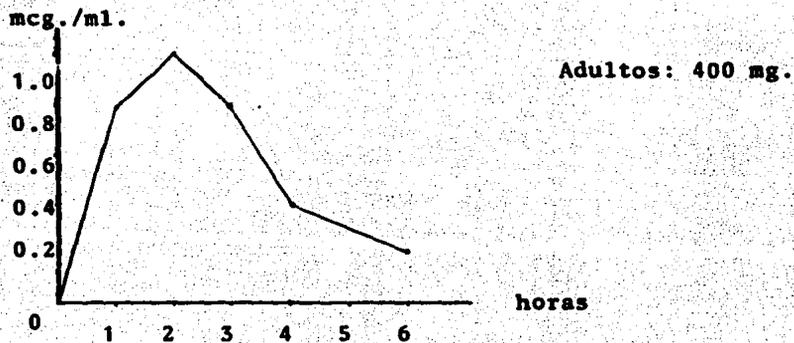
La MIDECAMICYNA es altamente activa contra staphilococcus, pneumococcus y Mycoplasma pneumoniae. La MIDECAMICYNA es también efectiva contra staphilococcus resistentes a la penicilina, estreptomina, cloranfenicol, etc.

INDUCCION DE RESISTENCIA.- La MIDECAMICYNA es diferente de la eritromicina y oleandomicina en que no induce resistencia en ciertos tipos de Staphilococcus, por esta razón, la MIDECAMICYNA es recomendable como una substancia antibiótica de primera clase.

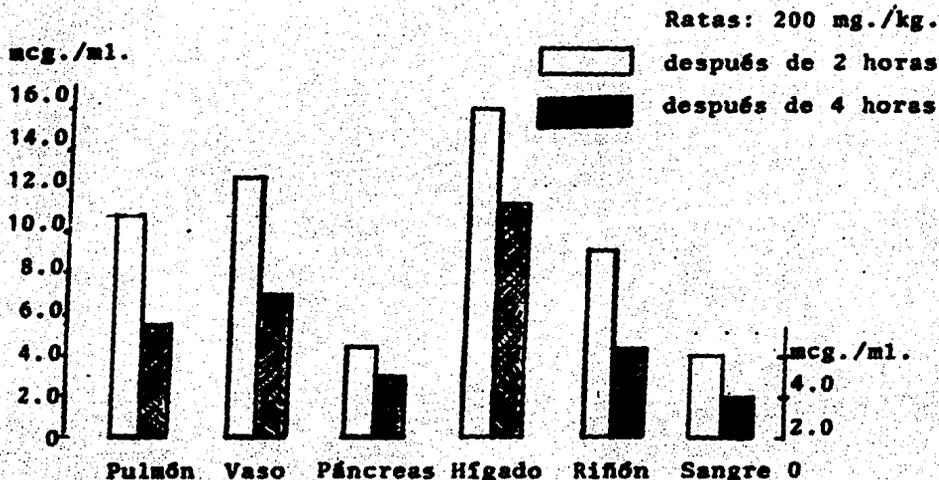
ABSORCION, DISTRIBUCION y EXCRECION EN ORINA. La MIDECAMICYNA es recomendable para tratamientos de infecciones del tracto respiratorio y enfermedades supurativas de la piel, después de la administración oral, el resultado es una alta concentración en los órganos internos, especialmente en el pulmón y la piel.

CONCENTRACION EN SANGRE Y EXCRECION EN ORINA.- La MIDECAMICYNA alcanza un pico de máxima concentración en sangre después de dos horas de su administración oral, y la orina elimina dentro de las 12 horas siguientes, un 26.3 por ciento.

CONCENTRACION EN SANGRE



CONCENTRACION EN ORGANOS.- De la administración oral de MI-DECAMICYNA, resultan altas concentraciones en órganos internos y los niveles relativos en los órganos exceden el o los niveles sanguíneos.



La MIDECAMICYNA se encuentra en elevadas concentraciones en la piel después de la administración oral.

TOXICIDAD.- La toxicidad de la MIDECAMICYNA ha sido comprobada que es muy baja.

TOXICIDAD AGUDA POR VIA ORAL

RATONES		RATAS	
Masculino	Femenino	Masculino	Femenino
7,200	5,800	12,000	9,600

TOXICIDAD CRONICA POR VIA SUBCUTANEA.- En la toxicidad crónica por vía subcutánea, estudiada en ratas, conejos y perros. Todas las pruebas con animales han dado como resultado, una satisfactoria tolerancia; exámenes bioquímicos e histopatológicos, demostraron que la droga no induce anormalidades. La dosis empleada en un mes para el estudio de la toxicidad subcutánea fue de 250 a 400 mg./kg./dia para ratas y de 40 a 400 mg./kg./dia para conejos.

TERAGENICIDAD.- La MIDECAMICYNA fue administrada a ratas y ratones preñados, oralmente por seis días en dosis de 500 a 3,000 mg./kg./dia para estudiar los efectos en sus fetos, y se pudo comprobar que la droga no induce anormalidades en el crecimiento, ni deformaciones físicas; tampoco afecta órganos internos, ni la estructura ósea.

EFICACIA EN INFECCIONES	
INFECCION	EFICACIA EN PORCIENTO
Infeción superficial supurativa	84.0%
Infeción supurativa aguda	70.8%
Infecciones del tracto respiratorio	79.1%
Infecciones del tracto genitourinario	60.0%
Infecciones del oído y nariz	85.7%

EFECTIVIDAD CONTRA EL AGENTE CAUSAL	
ORGANISMO CAUSAL	EFICACIA EN PORCIENTO
Staphylococcus aureus	80.5%
Staphylococcus epidermis	80.0%
Streptococcus hemoliticus	75.0%
Diplococcus pneumoniae	85.7%

EFFECTOS SECUNDARIOS.- Mediante estudios clínicos, se pudo observar que de 1,152 casos, sólo 55 de ellos presentaron efectos secundarios (4.77%). La mayor parte de los pacientes que presentaron efectos secundarios hablaron de trastornos gastrointestinales.

SINTOMAS OBSERVADOS	NUMERO DE CASOS
Malestar gástrico	9
Anorexia (falta de apetito)	7
Dolor estomacal	4
Náuseas	2
Náuseas y vómitos	2
Dolor del Epigastrio	2
Diarrea	2
Erupción o Urticaria	6
Taquicardia	2
Vértigo	1
Dolor de cabeza y vómito	1
Dolor de las extremidades	1
Disminuye la cantidad de Poliurea (PSP) y hay dolor a la micción	1
Otros	15

NOTA: La MIDECAMICYNA ha sido tratada con un derivado de la celulosa; se hizo ésto con el objeto de reducir los posibles trastornos gastrointestinales que ocurren con frecuencia en algunos antibióticos.

POSOLOGIA.- La dosis usual para adultos es de 800mg. a 1200 mg. (potencia); administrado oralmente, dividido en 3 ó 4 dosis al día.

2.2 ESPECIFICACIONES. (MIDECAMICYNA)

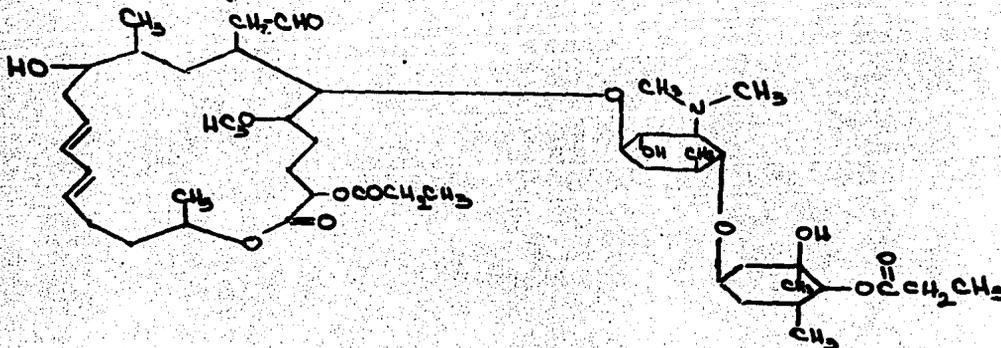
DESCRIPCION.- Polvo blanco cristalino, inodoro, de sabor muy amargo. Es muy soluble en metanol, totalmente soluble en acetona, en etanol, cloroformo, acetato de etilo y acetato de butilo, ligeramente soluble en agua; insoluble en éter de petróleo y en hexano.

IDENTIFICACION.- A dos miligramos de la muestra, adicione 5 ml. de ácido sulfúrico y disuelva; se produce un color café rojizo.

Nombre genérico: MIDECAMICYN.

Nombre químico: 7(formilmetil)-10-hidroxi-5 metoxi-9, 16 dimetil 4-(propioniloxi)-2-oxo-oxaciclohexadeca-11, 13-dien-6 il 3, 6-dideoxi-4-0-(2,6-dideoxi-3-Ometil-4-0-propionil-ribo-hexapyranosil)-3-(dimetilamino)-B-D-glucopiranosido.

ESTRUCTURA QUIMICA:



Para niños son 30 mg./kg. (pot.) oralmente, también dividido en 3 ó 4 tomas al día.

FORMULA MOLECULAR: $C_{14}H_{67}N O_{15}$

PESO MOLECULAR: 813.99

PUNTO DE FUSION: 154-156°C

POTENCIA: No menos de 800 mcg./mg. (por ensayo microbiológico).

PERDIDA AL SECADO: No más del 2%.

METALES PESADOS: No más de 30 partes por millón.

RESIDUOS DE IGNICION: No más del 0.2%

TOXICIDAD: Exenta

DENSIDAD APARENTE:

LIGERO: No más de 25 ml. para 10g.

PESADO: No más de 20 ml. para 10g.

2.3 METODOS QUIMICOS

TITULACION EN SOLVENTES NO ACUOSOS.

Una muestra cuidadosamente pesada, se disuelve en 100 ml. de ácido acético glacial. Se adicionan de 3 a 5 gotas de indicador (cristal violeta) y se titula con solución de ácido perclórico 0.1N, hasta que se observe un cambio de coloración que va del violeta al verde esmeralda, el cual nos marca el punto final de la titulación, correr un blanco y hacer las correcciones necesarias en cada una de las titulaciones efectuadas.

Calcular la potencia utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de MICECAMICYNA} = \frac{(v_1 - v_2) \times N \times \text{m.e.} \times 100}{\text{p.m.}}$$

en donde:

v_1 = es el volumen de ácido perclórico utilizado para titular el blanco.

v_2 = es el volumen de ácido perclórico utilizado para titular la muestra, en este caso, MIDECAMICYNA.

N = la normalidad de la solución de ácido perclórico utilizado en las titulaciones.

m.e. = el miliequivalente de la solución de ácido perclórico.

p.m. = peso de la muestra en miligramos.

REACTIVOS UTILIZADOS:

Solución de ácido perclórico 0.1 N; Mezclar cuidadosamente 8.5 mililitros de ácido perclórico al 72%, dentro de un matraz volumétrico conteniendo previamente, 500 mililitros de solución de ácido acético glacial, se adicionan 21 mililitros de anhídrido acético (para hacer reaccionar el agua captada durante el proceso), la mezcla es diluida a un litro con ácido acético glacial y se deja reposar toda la noche.

Normalización de la solución de ácido perclórico; Pesar exactamente 700 miligramos de bi-oftalato de potasio, previamente homogeneizado y desecado a 120°C, por dos horas, disolver en 50 ml. de ácido acético glacial en un matraz de 250 ml., adicionar dos gotas de cristal violeta TS, titular con el ácido perclórico hasta que cambie de violeta a verde esmeralda, obtener el volumen de ácido perclórico consumido por 50 mililitros de ácido acético glacial y calcular la normalidad. Cada 20.42 mg. de bi-oftalato de potasio equivalen a un mililitro de ácido perclórico 0.1 N.

Cristal Violeta T.S.: Disolver 100 miligramos de violeta de metilo en 100 ml. de ácido acético glacial y mezclar perfectamente, Pipetear un mililitro de la solución dentro de un matraz volumétrico de 100 ml. y diluir con ácido acético glacial, no más de 0.1 ml. de la solución de ácido perclórico 0.1 N es requerida para producir un color verde esmeralda.

Este método de determinación química para MIDECAMICYNA fue desarrollado en los laboratorios donde se realizó este trabajo y se recomienda SOLO PARA MATERIA PRIMA, ya que en el producto terminado (Cápsulas y suspensión) interfieren los componentes de las fórmulas.

Espectro de absorción al ultravioleta.- Pesar el equivalente de 100 miligramos de MIDECAMICYNA y disolver en 50 mililitros de metanol. El espectro de absorción al ultravioleta de esta solución, presenta un máximo a una longitud de onda de 230 a 233 nm. y un mínimo de 257 a 260 nm.

2.4 METODO MICROBIOLOGICO

- A) Organismo de prueba usado: *Bacillus Subtilis* ATCC 6633
- B) Preparación de la solución estandar de trabajo: Pesar cuidadosamente 20 mg. (potencia) del estandar de MIDECA-MICYNA, disolver en 10 ml. de metanol y adicionar suficiente agua para hacer 400 mcg. (potencia) por milímetro, para la solución de referencia.

Esta solución se puede usar durante los siguientes siete días, si se conserva a temperatura de 5°C o menos, tomar una alícuota de la solución de referencia tal, que se llegue a obtener diluciones que contengan: 5mcg./ml.; 10mcg./ml.; 15mcg./ml. 20mcg./ml.; y 25mcg./ml. (usando para todas estas diluciones una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH8 como diluyente.

FORMA DE HACER LAS DILUCIONES:

Partiendo del hecho conocido de que la solución de referencia contiene 400mcg./ml. si tomamos una alícuota de 12.5 ml. tendremos entonces: 5,000 mcg.; si estos 5,000mcg. los aforamos a 100 ml. tendremos:

$$\begin{array}{r} 5,000 \text{ mcg.} \text{ -----} 100 \text{ ml.} \\ X \text{ \hspace{10em}} \text{ -----} 1 \text{ ml. } X = 50 \text{mcg./ml. (potencia)} \end{array}$$

Si a partir de esta dilución hacemos las diluciones necesarias para la curva estandar, se harán como sigue:

Dilución de la cual partimos: 50 mcg./ml. (potencia).

ALICUOTA	Mcg.	Solución Amortiguadora	Total de Aforo	Concentración Final
1.- 1ml.	50mcg.	9ml.-----10cc.	$\frac{50mcg.}{10ml.} =$	5mcg./ml.(potencia)
2.- 2ml.	100mcg.	8ml.-----10cc.	$\frac{100mcg.}{10ml.} =$	10mcg./ml.(potencia)
3.- 3ml.	150mcg.	7ml.-----10cc.	$\frac{150mcg.}{10ml.} =$	15mcg./ml.(potencia)
4.- 4ml.	200mcg.	6ml.-----10cc.	$\frac{200mcg.}{10ml.} =$	20mcg./ml.(potencia)
5.- 5ml.	250mcg.	5ml.-----10cc.	$\frac{250mcg.}{10ml.} =$	25mcg./ml.(potencia)

C) Preparación de la solución de prueba.- Pesar cuidadosamente el contenido equivalente a 40 mg.(potencia) de decamicyn, disolver en 10 ml. de metanol y adicionar suficiente agua destilada para hacer u obtener una solución con 400 mcg. (potencia) por cada mililitro. Filtrar o centrifugar para las substancias insolubles si es necesario. Siguiendo el esquema anterior, realice las diluciones antes citadas, usando como diluyente para todas ellas fosfatos 0.1 M pH 8.

PARTE EXPERIMENTAL

Método Microbiológico.- Determinación de la potencia de MIDECAMICYNA por el método microbiológico en placa utilizando como organismo de prueba Bacillus Subtilis ^{ATCC} ATCC 6633.

Medios de cultivo utilizados:

Medio No. 1 (seed o semilla)

Cuya composición en gramos por litro, es la siguiente:

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

Disolver 30.5 gramos en un litro de agua destilada, ajustar el pH a 8 y después esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C y 5 atmósferas de presión.

Medio No. 2 (medio base)

Cuya composición es la siguiente, en gramos por litro:

Extracto de carne	1.5 g.
Extracto de levadura	3.0 g.
Peptona	6.0 g.
Agar	15.0 g.

Disolver 25.5 g. en un litro de agua destilada, ajustar el pH a 8 y después esterilizar en autoclave por 15 minutos a 5 atmósferas de presión y 121°C de temperatura.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH=7.8 a 8

Fosfato monobásico de potasio 0.90 g.

Fosfato debásico de sodio (anhidro) 13.2 g.

Disolver en 750 ml. de agua, si es necesario, ajústese el pH a 7.8 a 8 con solución de hidróxido de potasio 10N o ácido fosfórico 16N, y adicionar agua cuanto baste para 1000 ml.

Microorganismo utilizado en la determinación: Se utilizó la cepa de Bacillus subtilis ATCC 6633.

Preparación del Inóculo.

- a) Preparar un cultivo de esporas sembranco Bacillus Subtilis ATCC 6633 en un tubo con agar inclinado medio No. 1, incubar durante 16 a 24 horas a 37°C, al cabo de los cuales, se lava el desarrollo de los tubos usando diez mililitros de solución salina estéril, y extiéndalo usando esferas de vidrio estéril, sobre la superficie de una caja o botella de Roux que contenga 300 ml. del mismo medio del cultivo estéril que ha sido adicionado con sulfato ácido de manganeso en concentración de 300 mg. por litro de medio, previamente solidificado.
- b) Incúbese la siembra anterior durante 5 días a 32-35°C.

c) Lave el desarrollo resultante sobre la superficie de agar con 50 ml. de solución salina estéril, caliente ésta suspensión en baño maría a 70°C, por espacio de 30 minutos, centrifugue y lave con tres porciones de 10 ml. de agua estéril, repita esta operación desde calentar, centrifugar y lavar, tres veces; suspenda finalmente en 100 ml. de agua estéril y caliente otra vez por espacio de 30 minutos, deje estas esporas en suspensión de 5 a 15°C. Determine la cantidad de suspensión que se adicione a cada 100 ml. de medio No. 1 (seed o semilla) que debe dar una clara zona de inhibición.

d) Estandarización de la suspensión.- Determine el factor de dilución que nos dará un 25% de transmitancia de luz a una longitud de onda de 580 milimicras; usando un tubo de prueba o celda de absorción de 13 mm de diámetro. Determine la cantidad de la suspensión que debe adicionarse a cada 100 ml. de medio No. 1 (semilla). En este caso particular se encontró que era necesario un mililitro de la suspensión de esporas cosechadas por cada 100 ml. de agar Medio No. 1 (capa semilla).

Preparación de las cajas.

a) Distribuir horizontalmente 21 mililitros de agar Medio No. 2 (capa base) fundidos a cajas de Petri de 20x100mm.

- b) Cubrir las cajas con tapas apropiadas, de porcelana vi-
driada y dejar endurecer el medio, siendo ésta la capa
base.
- c) Preparar la capa semilla agregándole la cantidad de sus-
pensión de esporas apropiada a cada 100 mililitros de
agar Medio No. 1 fundido y enfriado a 49°C, mezclar el
inóculo con el agar cuidadosamente y agréguese 4 milili-
tros a cada una de las cajas de Petri que contienen los
21 mililitros de agar solidificado.

Muévanse las cajas de Petri en forma circular para dis-
tribuir uniformemente el agar inoculado sobre la capa
base, de agar solidificado.

- d) Colóquense 6 cilindros de acero inoxidable, de diámetro
interno de 6 milímetros, estériles sobre la superficie
del agar inoculado a intervalos de 60° y en radios de
2.8 cm.

Preparación de la solución patrón (tipo) de MIDECA-
MICYNA.

Patrón: El término patrón de MIDECAMICYNA (Midecamicyn Mas-
ter Standar), significa un lote específico de MIDECAMICYNA
que contiene 834 mcg. (Pot.)/mg. de MIDECAMICYNA, designada

por el Instituto Nacional de la Salud del Japón como el patrón de comparación para la determinación de la potencia para el ensayo.

Preparación de la curva tipo (estandar).

Preparar la curva tipo usando concentraciones de la solución patrón de MIDECAMICYNA para tener 5,10,15 (punto de referencia), 20 y 25 mcg./ml. diluyéndolas con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7.8 a 8.

1. Pesar cuidadosamente no menos de 5 cápsulas (cápsula más contenido). Vaciar el contenido de las cápsulas, mezclarlo y homogeneizarlo. Lavar el contenido remanente de las cápsulas con pequeñas porciones de éter y vaciar con el resto del contenido de las cápsulas, remover el éter por evaporación a temperatura ambiente, volver a pesar las cápsulas vacías y calcular el peso de las cápsulas.
2. Pesar cuidadosamente el equivalente a 40 mg. (potencia estimada) de MIDECAMICYNA, disolver en 50 ml. de metanol adicionar suficiente agua para hacer 400 mcg./ml. (Pot. estimada); siendo esta la solución denominada "B". Continuar con los pasos descritos en la preparación de las muestras descritas para suspensión de MIDECAMICYNA, has-

ta obtener una concentración final de 15 mcg./ml. de MI-DECAMICYNA.

Procedimiento para el ensayo.

Para la línea de respuesta estandar, use un total de 12 cajas de Petri, tres cajas para cada concentración, excepto para la concentración de referencia, la cual está incluida en cada caja.

En cada conjunto de tres platos, llene tres cilindros alternados con la concentración de referencia y los otros tres con cada concentración.

Así quedarán 36 cilindros con la concentración de referencia y nueve cilindros con cada una de las concentraciones restantes.

Incubar las placas durante 16 a 18 horas a 36°- 37°C, medir el diámetro de cada halo de inhibición aproximándose décimas de milímetro, usando un medio apropiado para medir, el cual puede ser: regla milimétrica, compás de calibrar, Vernier, etc.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIA PRIMA

A continuación se presenta una tabla que nos ejemplifica como llegar a las concentraciones antes citadas, de una solución patrón de MIDECAMICYNA que contiene 50 mcg.(pot.)/ml., si de esta solución tomamos:

ALICUOTA	SOLUCION AMORTIGUADORA	CONCENTRACION
1.0 mililitros c.b.p.	10 ml.	5mcg./ml.
2.0 mililitros c.b.p.	10 ml.	10mcg./ml.
3.0 mililitros c.b.p.	10 ml.	15mcg./ml.
4.0 mililitros c.p.p.	10 ml.	20mcg./ml.
5.0 mililitros c.b.p.	10 ml.	25mcg./ml.

Preparación de las muestras:

3.2 Cápsulas de MIDECAMICYNA conteniendo 200 mg./cápsula.

Diluir una porción conveniente para obtener 15 mcg./ml.

1. Pesar cuidadosamente no menos de 5 cápsulas (cápsulas más contenido), vaciar el contenido de las cápsulas, mezclarlo y homogeneizarlo, lavar el contenido remanente de las cápsulas con pequeñas porciones de éter y vaciar con el resto del contenido de las cápsulas, remover

el éter por evaporación a temperatura ambiente, volver a pesar las cápsulas vacías y calcular el peso de las cápsulas.

2. Pesar cuidadosamente el equivalente a 40 mg. (potencia estimada) de MIDECAMICYNA, disolver en 50 ml. de metanol, adicionar suficiente agua para hacer 400mcg./ml. (pot. estimada), siendo ésta la solución denominada "B".
 3. Tomar de la solución "B" 12.5 ml. (5000mcg.) y llevar a 100 ml. con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH8 obteniendo así una concentración de 50mcg./ml. Siendo ésta la solución "C".
 4. Tomar de la solución "C", 3 mililitros y llevar a 10 ml. con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH8, obteniendo así una concentración final de 15mcg./ml.
- 3.3 Polvo para reconstituir al momento de usarse conteniendo 1200 mg./frasco de MIDECAMICYNA.
1. Agregar al frasco que contiene 1200 mg. de MIDECAMICYNA agua a la marca señalada en la etiqueta aproximadamente 60 mililitros, obteniendo la solución "A" con una concentración de 20 mg./ml.
 2. Tomar de la solución "A" un mililitro (20,000 mcg.) y llevar a 50 mililitros utilizando los primeros 10 mililitros de metanol para disolver la MIDECAMICYNA y cuanto baste para 50 mililitros de solución amortiguadora de

fosfatos 0.1M pH 8, siendo ésta la solución "B" que contendrá 400 mcg./ml. de MIDECAMICYNA. Continuar con los pasos descritos en la preparación de las muestras descritas para cápsulas de MIDECAMICYNA, hasta obtener una concentración final de 15 mcg./ml. de MIDECAMICYNA.

Procedimiento para el ensayo.

1. Para las líneas de respuesta patrón, use un total de 12 cajas; tres cajas para cada concentración, excepto para la concentración de referencia, la cual está incluida en cada caja.

En cada conjunto de tres cajas, llene tres cilindros alternados con la concentración de referencia y los otros tres con cada concentración.

Así quedarán 36 cilindros con la concentración de referencia y 9 cilindros con cada una de las concentraciones restantes.

Incubar las cajas durante 16 a 18 horas a 36°- 37°C, medir el diámetro de cada halo de inhibición aproximándose a décimas de milímetro, usando un medio apropiado para medir, el cual puede ser: regla milimétrica, compás de calibrar, vernier, etc.

Estimación de la potencia.

Promedie las lecturas de la concentración de 15mcg./ml. y las lecturas de cada punto en cada grupo de tres placas y promedie las 36 lecturas de la concentración de 15 mcg./ml. (punto de corrección), es de 16.5mm. y que el promedio de esta misma concentración en el grupo de tres placas de 25mcg./ml. es de 16.3 mm., la corrección será de 0.2 milímetros, si el promedio de las lecturas de la concentración de 25 mcg./ml. es de 16.9 mm., el valor corregido será de 17.1 milímetros.

Graficar los valores, incluyendo el promedio de las 36 lecturas de 15 mcg./ml. en papel semilogarítmico de dos ciclos, colocándose las concentraciones en unidades por milímetros como abscisas. Se traza la curva estandar a través de estos puntos por medio de las siguientes ecuaciones:

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

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

En donde:

L = diámetro corregido de la concentración más baja de la curva.

H = Es el diámetro corregido de la concentración más alta de la curva.

c = Es el diámetro promedio de las 36 lecturas de la concentración de 15mcg./ml. (punto de referencia).

a, b, c, e, = Son los promedios corregidos de las lecturas de las concentraciones de 5, 10, 20 y 25 mcg./ml. respectivamente.

Procedimiento de la muestra:

Emplear tres placas para cada muestra (tres más para cada muestra adicional), llenar tres cilindros de cada placa con la solución o patrón correspondiente a 15 mcg./ml. y los otros tres alternados con la muestra, cuya concentración teórica es de 15 mcg./ml. Incubar las placas durante 16 a 18 horas a 27°- 36°C, y medir el diámetro de cada halo de inhibición, aproximando a décimas de milímetro, utilizando un proyector o medio adecuado.

Para calcular la concentración de la muestra promediar las lecturas de la dilución intermedia patrón (15mcg./ml.) y las lecturas de la muestra.

Si el valor del promedio de la muestra da un diámetro mayor que el promedio del patrón, agregar la diferencia entre ellos al valor de 15 mcg./ml. en la curva.

Si la muestra da un promedio de diámetro menor que el valor del patrón, la diferencia entre ellos se resta al valor de 15 mcg./ml. de la curva, leer las concentraciones correspondientes a los valores corregidos de las zonas y determinar la potencia, utilizando el factor de dilución.

El método aquí descrito fue proporcionado por la casa matriz productora del antibiótico, el cual al ser desarrollado en el laboratorio de control de calidad, en donde se efectuó este trabajo, se hicieron pequeñas modificaciones de acuerdo a los sistemas implantados y validado para la determinación interna en la valoración microbiológica de antibióticos; siguiendo las legislaciones vigentes.

Los cambios realizados fueron los siguientes:

1. Medio de cultivo utilizando Bacto-Antibiotic Medio No. 1 y Bacto- Antibiotic Medio No. 2, con las mismas concentraciones ya descritas con anterioridad en este trabajo.
2. Solución amortiguadora utilizada en la prueba; solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8, cuya preparación fue descrita anteriormente.
3. Microorganismo de prueba utilizado en la determinación fue *Bacillus Subtillis* ATCC 6633.

4. Preparación del inóculo. Preparado de la misma forma antes descrita.

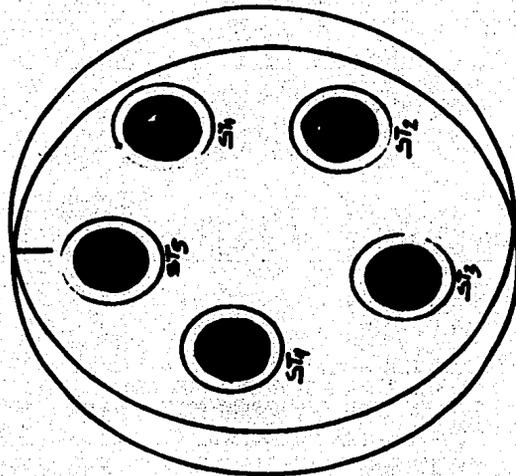
5. Preparación de las placas.
 - a) Distribuir 21 ml. de agar Bacto-Antibiotic Medio No.2 fundido en 10 cajas de Petri estériles, 6 cajas corresponderán a la curva patrón o estandar y cuatro cajas para el problema, agregando cuatro cajas más para cada problema adicional, dejar solidificar, ésta es la capa base.

 - b) Agregar la cantidad adecuada de la suspensión de esporas ya ajustadas para cada 100 ml. de agar Bacto-Antibiotic Medio No. 1 previamente fundido y enfriado a 48°C (1 ml. de suspensión de esporas que pueden ser tomadas directamente de la botella de Roux o tratadas por calentamiento, centrifugación y lavados sucesivos, como se indica anteriormente)

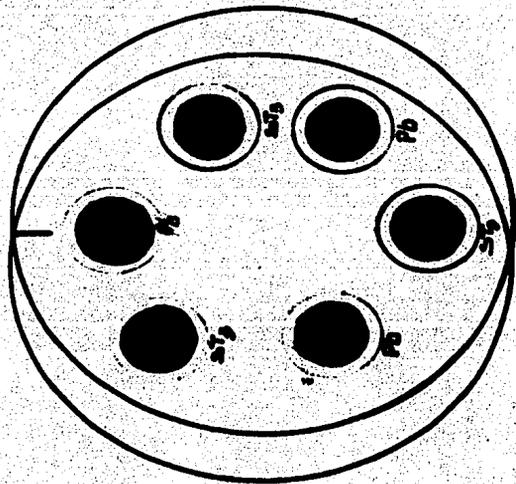
 - c) Mezclar el inóculo con el agar cuidadosamente y agregar cuatro mililitros de esta mezcla a cada placa conteniendo 21 mililitros de agar sin inocular y solidificado, moviendo en forma circular para distribuir uniformemente el agar inoculado, sobre la base de agar.

- d) Colocar seis cilindros estériles de acero inoxidable de diámetro interno de seis milímetros en la superficie del agar inoculado a intervalos de 60° y en radios de 2.8 centímetros.
6. Preparación de la solución patrón de MIDECAMICYNA.- La solución fue hecha como ya se indicó antes.
7. Preparación de la curva tipo.- La preparación se realizó de la manera ya anotada anteriormente, así como la preparación de las muestras.
8. Procedimiento para el ensayo.- En cada una de las seis placas, llenar cinco cilindros con cada una de las concentraciones (5, 10, 15 o concentración intermedia de referencia 20 y 25 mcg./ml.) como a continuación se esquematiza.

Cuma Patron



Muestra



En las cuatro cajas restantes alternando, llenar tres cilindros con la solución patrón correspondiente a 15 mcg./ml., y tres cilindros con la muestra problema cuya concentración teórica es de 15 microgramos por mililitro.

Incubar las placas durante 16 a 18 horas a 36°- 37°C y medir el diámetro de cada halo de inhibición, aproximado a décimas de milímetro, utilizando en este caso, un medidor de halos de inhibición. Promediar las lecturas de la concentración de referencia 15 mcg./ml. en el grupo de seis placas y las lecturas de cada punto en las mismas que correspondan a a, b, d y e.

Aplicar las fórmulas siguientes:

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

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

L = es el diámetro corregido de la concentración más baja de la curva.

H = es el diámetro corregido de la concentración más alta de la curva.

c = es el diámetro promedio de las concentraciones leídas para 15 mcg./ml.

a, b, d y e, son los promedios corregidos de las lectu-

ras de las concentraciones de 5, 10, 20 y 25 microgramos por mililitro.

Graficar los dos puntos obtenidos mediante las fórmulas anteriores en papel semilogarítmico de dos ciclos correspondiendo las ordenadas a las concentraciones en microgramos por mililitro y las abscisas al diámetro en milímetros de las zonas de inhibición.

Interpolando la concentración de 15 mcg./ml. en la gráfica obtenida con los dos puntos anteriores, obtendremos el valor corregido en milímetros de la concentración intermedia.

Promediar enseguida, las 12 lecturas obtenidas en las cuatro cajas restantes de la dilución intermedia (15 mcg./ml.) y las 12 lecturas de la solución problema (concentración teórica de 15 mcg./ml.), ésto nos servirá para calcular la concentración encontrada de la muestra.

De esta forma tendremos los siguientes datos:

1. Valor corregido en la curva de la concentración de referencia del patrón, o sea 15 mcg./ml.
2. Promedio de las lecturas de la solución patrón corrida junto con la muestra problema.

3. Promedio de las lecturas de nuestro problema.

Al valor corregido en la curva de 15 mcg./ml. de la solución tipo, réstese el promedio de las lecturas de la solución patrón corrida junto con la muestra.

Si el promedio de las lecturas de la solución patrón corrido junto con la muestra es menor que el valor corregido en la curva de 15 mcg./ml., la diferencia se sumará al promedio de las lecturas de las muestras problema; si es mayor se le resta, de este modo, tendremos el valor corregido para el promedio de las lecturas de la muestra problema; con este dato obtenido en milímetros, lo llevamos a la curva ya trazada en el papel semilogarítmico de dos ciclos y extrapolando obtenemos el valor de la concentración en microgramos por mililitro de la muestra problema.

Cálculos utilizando el factor de dilución para obtener microgramos por miligramo.

Microgramos/mililitro X 1er. aforo X 2do. aforo = mcg./mg.
Peso de la muestra en mg. o ml. x 1a. Alic. x 2a. Alic.

METODO DE DIFUSION EN PLACA CON DISCOS DE PAPEL.

1. Discos de papel filtro de 9 milímetros de diámetro para la preparación de la curva patrón, así como para la muestra, se procede de la misma manera que para el método de difusión en placa con cilindros de acero inoxidable; la única variación es la utilización y preparación de los discos de papel para poder efectuar la prueba.

Para la realización de la curva patrón:

Teniendo las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mcg./ml., preparadas a partir de la solución patrón, diluyéndolas con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 8. Usar seis placas para correr la curva patrón o estandar incluyendo la de 15 mcg./ml. que se usará como punto de referencia y se incluirá en cada placa (un total de 10 placas) como ya antes se había explicado. En cada una de las seis placas, colocar un sensidisco previamente humedecido con cada concentración en caso que sea necesario secar el exceso de humedad antes de colocarlo, procurando que dicho secado sea uniforme para todas las concentraciones.

En las cuatro cajas restantes, colocar tres sensidiscos previamente humedecidos con la solución patrón correspondiente a 15 mcg./ml. y tres sensidiscos humedecidos con la muestra

cuya concentración teórica es de 15 mcg./ml. alternándolos (como se observa en la figura).

Incubar las placas durante 16 a 18 horas a 36°- 38°C. Medir el diámetro de cada halo de inhibición aproximando a décimas de milímetro usando un proyector adecuado.

Promediar las lecturas de la concentración de 15 mcg./ml. y las lecturas de cada punto en el grupo de seis placas.

Hacer las correcciones para la obtención de los dos puntos aplicando las fórmulas ya mencionadas, de igual manera como se hizo en el método anterior, graficando en papel semilogarítmico de dos ciclos, colocando las concentraciones en microgramos por mililitro como ordenadas y como abscisas el diámetro de las zonas de inhibición en milímetros.

Trazar la curva correspondiente, interpolando el promedio de las lecturas de la concentración de 15 mcg./ml. (punto de referencia), para tener el valor corregido en milímetros de la concentración intermedia del patrón.

Promediar a continuación, las 12 lecturas obtenidas en las cuatro placas restantes de la dilución intermedia (15 mcg./ml.), ésto nos dará por resultado la concentración corregida de la muestra.

Si el promedio de las lecturas de la solución patrón, corrida con la muestra es menor que el valor corregido de la curva, de 15 mcg./ml., la diferencia se sumará al promedio de las lecturas de la muestra problema; si es mayor, se le restará teniendo de esta manera, el valor corregido para el promedio de las lecturas de la muestra problema, con este dato obtenido en milímetros, lo llevamos a la curva trazada en papel semilogarítmicos de 2 ciclos; extrapolando obtendremos el valor de la concentración en microgramos por miligramo, utilizando el factor de dilución, como a continuación se indica:

$$\frac{\text{mcg./ml.} \times \text{1er. aforo} \times \text{2o. aforo}}{\text{Peso mta. (mg. o ml.)} \times \text{1a. Alic.} \times \text{2a. Alic.}} = \text{mcg./mg.}$$

Producto Micromonograma
adipulas

LABORATORIOS DE CONTROL BIOLÓGICO Y QUÍMICO

Fecha _____
Análisis No. _____

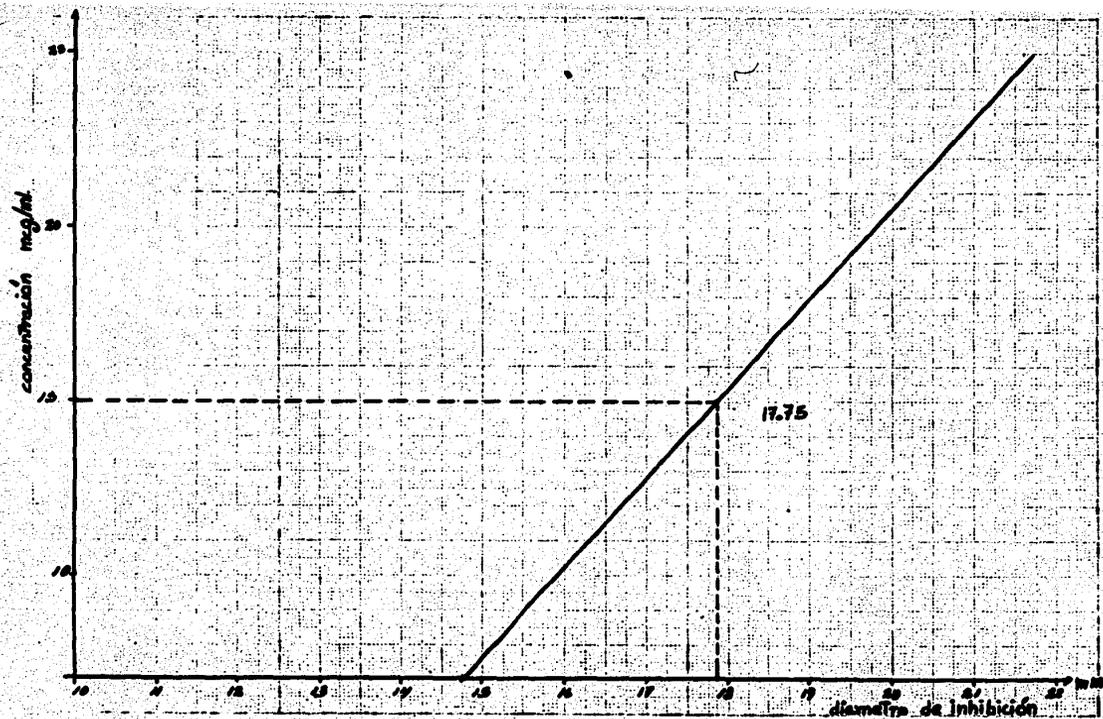
MUESTRA	DILUCION	INIBICION en mm						PROMEDIO	COMEQ.	U/ml.	TOTAL	OBSERVACIONES	
		1	2	3	4	5	6						
St	25mg/ml	22.5	22.0	22.0	22.5	22	22	22.25					
St	10mg/ml	13.5	13.0	13.5	13.0	13.0	13	13.25					
St	10mg/ml	12.0	12	12	12	12	12	12.25					
St	10mg/ml	16.5	16.5	17	17	17	16.8	16.88					
St	5mg/ml	15.5	15.5	16	16	16	16	15.35					
		$M = \frac{2(22.25) + 2(13.25) + 12.25 + 16.88 + 15.35}{5} = 15.62$											
		$M = \frac{2(12.25) + 2(16.88) + 17.25 + 22.25}{5} = 17.20$											
		Cápsulas 200mg/cap. susp. ppm 278mg											
St	10mg/ml	12	12.5	12	12			12.62					
Ph	" " "	12	12.5	12.5	12			12.58				St = 12.58	
St	" " "	12	12.5	12.5	12			12.58				M = 12.58	
Ph	" " "	12	12.5	12.5	12.5			12.58					
St	" " "		12.5	12	12.5			12.58					
Ph	" " "	12	12.5	12	12.5			12.58					
		CONCENTRACION											
		$12.58 - 12.58 = 0.0$											
		$12.58 - 0.0 = 12.58$											
		Solución 10.5mg/ml x 10ml x 10ml = 200mg/ml = 100%											
		$\frac{1}{N} \frac{12.58}{10}$											

LABORATORIOS DE CONTROL BIOLÓGICO Y QUÍMICO

 Producto _____

 Fecha _____
 Análisis No. _____

MUESTRA	DILUCION	INIBICION en mm.					PROMEDIO	CORREC.	UMI.	TOTAL	OBSERVACIONES
		Pérox para muestra diluida y muestra de referencia									
2h	1E(mg/ml)	19	19	19	19		19				
Ph	" " "	19	19	18.8	19		18.9				
3h	" " "	19	19	19	19		18.90				
Ch	" " "	19	19	19	19		18.90				
Sh	" " "	19	19	19	19		19				
Ph	" " "	19	19	19	19		19				
		H = 21.60		Sh = 18.80							
		L = 18.20		Ph = 18.75							
		Conversion									
		18.90 - 17.78 = 1.02									
		18.30 - 1.00 = 17.30									
		14.8	50	100	10	60	112,500.8 mg / 10000				
				12.5	5		112,500.8 mg / 5000				
							5.97.25%				



3.3 RESULTADOS

METODO: Titulación en solventes no acuosos.

MATERIA PRIMA

Potencia de la substancia de referencia: 834mcg./mg.

PESO DE LA MUESTRA	P O T E N C I A	
	mcg./mg.	%
1.- 208 mg.	821.52	98.52
2.- 218 mg.	821.3	98.47
3.- 218 mg.	821.3	98.47
4.- 222 mg.	821.1	98.45
5.- 222 mg.	821.1	98.45
6.- 217 mg.	821.0	98.44
7.- 208 mg.	821.7	98.52
8.- 205 mg.	821.0	98.44
9.- 208 mg.	821.7	98.52
10.- 109 mg.	821.3	98.47
11.- 100 mg.	821.0	98.44
12.- 104 mg.	821.7	98.52
13.- 110 mg.	821.0	98.44

RESULTADOS:

ESPECTRO DE ABSORCION AL ULTRAVIOLETA.

LONGITUD DE ONDA	CONCENTRACION (mcg./ml.)			
	10	20	30	40
LECTURAS; absorbancia				
1.- 215 nm.	0.210	0.475	0.730	0.810
2.- 220 nm.	0.260	0.565	0.780	0.980
3.- 225 nm.	0.300	0.640	0.880	1.105
4.- 230 nm	0.330	0.670	0.925	1.200 MAXIMO
5.- 235 nm	0.278	0.570	0.800	1.010
6.- 240 nm	0.218	0.443	0.610	0.790
7.- 245 nm	0.099	0.210	0.275	0.313
8.- 250 nm	0.040	0.086	0.180	0.120
9.- 225 nm	0.028	0.068	0.080	0.085
10.- 260 nm	0.025	0.065	0.070	0.082 MINIMO
11.- 265 nm	0.030	0.070	0.080	0.089
12.- 270 nm	0.032	0.073	0.082	0.092
13.- 275 nm	0.032	0.075	0.082	0.091
14.- 280 nm	0.033	0.075	0.089	0.110
15.- 285 nm	0.035	0.075	0.090	---

1a. ETAPA

PRESENTACION: Cápsulas

Contenido: 200 mg. MIDECAMICYNA)

PENICILINDROS

SENSIDISCOS

POTENCIA

POTENCIA

<u>mg./cápsula</u>	<u>g</u>	<u>mg./cápsula</u>	<u>g</u>
1. 202.46	101.3	199.90	99.99
2. 201.00	100.8	199.22	99.61
3. 202.46	101.30	200.96	100.40
4. 199.90	99.95	199.99	99.99
5. 198.66	99.33	198.66	99.33
6. 199.90	99.95	199.50	99.75
7. 197.99	98.99	196.68	99.70
8. 199.96	99.98	199.99	99.99
9. 200.00	100.00	199.99	99.99
10. 199.40	99.70	198.10	99.05

2a. ETAPA

1. 201.90	101.3	199.20	100.19
2. 201.90	100.95	200.90	100.40
3. 196.60	98.34	196.60	98.34
4. 198.66	99.30	197.80	98.50
5. 199.90	99.95	199.90	99.95
6. 200.00	100.00	199.90	99.95
7. 201.60	100.08	198.60	99.30
8. 199.33	99.66	195.90	98.00
9. 202.60	101.10	199.36	99.68

RESULTADOS

PRESENTACION: Polvo para reconstituir al momento de usarse.

Contenido: 1200 mg. (MIDECAMICYNA)/frasco.

Una vez hecha la suspensión 20 mg. (MIDECAMICYNA)/ml.

PENICILINDROS

SENSIDISCOS

POTENCIA

POTENCIA

<u>mg./frasco</u>	<u>g</u>	<u>mg./frasco</u>	<u>g</u>
1. 1175.99	97.99	1176.1	98.0
2. 1196.68	99.72	1197.18	99.18
3. 1190.80	99.23	1190.23	99.18
4. 1200.00	100.00	1199.49	99.95
5. 1199.88	99.99	1197.32	99.77
6. 1199.88	99.99	1196.28	99.69
7. 1199.88	99.99	1197.68	99.80
8. 1199.40	99.95	1197.20	99.76
9. 1199.40	99.95	1197.20	99.76
10. 1197.80	99.81	1195.70	99.64
11. 1231.92	102.66	1230.02	102.50
12. 1213.20	101.10	1211.90	100.99
13. 1199.88	99.99	1199.88	99.99

2a. ETAPA.

PRESENTACION: Polvo para resuspender al momento de usarse.

Contenido: 1200 mg. (MIDECAMICYNA)/frasco.

Contenido por mililitro una vez hecha la suspensión: 20 mg.
(MIDECAMICYNA).

PENICILINDROS

SENSIDISCOS

POTENCIA

POTENCIA

<u>mg./frasco</u>	<u>i</u>	<u>mg./frasco</u>	<u>i</u>
1. 1195.92	99.66	1195.02	99.58
2. 1176.00	97.99	1181.90	98.49
3. 1191.60	99.30	1189.92	99.16
4. 1204.80	100.40	1202.30	100.19
5. 1214.78	101.20	1200.00	100.00
6. 1199.88	99.99	1197.00	99.75
7. 1231.80	102.65	1220.00	101.60
8. 1202.28	100.19	1195.32	99.61
9. 1197.00	99.75	1195.32	99.61
10. 1198.80	99.90	1198.80	99.90
11. 1199.88	99.99	1197.20	99.76
12. 1198.80	99.90	1198.80	99.90

$$\bar{x} = 1200.96$$

$$\bar{x} = 100.07$$

$$\bar{x} = 1197.60$$

$$\bar{x} = 99.79$$

PRUEBAS DE ESTABILIDAD

PRESENTACION: Cápsulas de 200 mg. MIDECAMICYNA.

Tiempo inicial; 3 meses a temperatura ambiente.

TIEMPO	TEMPERATURA			
	37°C		50°C	
	Potencia <u>mg./cap.</u>	<u>%</u>	Potencia <u>mg./cap.</u>	<u>%</u>
Inicial	202.46	101.25	196.68	98.34
8 dias	200.96	100.48	198.66	99.33
15 dias	199.22	99.61	199.90	99.95
30 dias	204.12	102.06	199.90	99.95
90 dias	199.90	99.95	199.90	99.95

PRESENTACION: Polvo para reconstituir

frasco 1200 mg (MIDECAMICYNA)

Tiempo inicial: 3 meses a temperatura ambiente.

TIEMPO	TEMPERATURA			
	37°C		50°C	
	Potencia <u>mg./frasco</u>	<u>%</u>	Potencia <u>mg./frasco</u>	<u>%</u>
Inicial	1175.97	97.99	1190.80	99.23
8 dias	1198.8	99.90	1214.78	101.23
15 dias	1198.8	99.90	1198.80	99.90
30 dias	1205.87	100.46	1199.90	99.99
90 dias	1207.87	100.65	1199.90	99.90

PRUEBAS DE ESTABILIDAD ACELERADA.

PRESENTACION: Suspensión

Contenido: Frasco con 60 ml. 20 mg.(MIDECAMICYNA)/ml.

Tiempo inicial: 3 meses de fabricado y almacenado a temperatura ambiente.

Temperat. Potencia	4°C		Temp. Amb.		37°C		50°C	
	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%
24hrs.	19.90	99.95	19.90	99.95	19.99	99.95	19.99	99.95
48hrs.	19.59	97.95	19.46	97.30	20.53	102.65	21.06	105.30
72hrs.	19.93	99.65	20.26	101.3	19.59	97.95	20.15	100.75
8 dias	19.99	99.95	19.59	97.95	19.19	95.95	19.95	99.75
10 dias	19.99	99.95	20.53	102.66	19.53	97.65	17.91	89.95
15 dias	19.99	99.95	19.99	99.95	19.75	98.75	8.66	43.30
20 dias	19.99	99.95	19.33	96.65	14.38	71.90	7.40	37.00
25 dias	19.86	99.30	16.92	84.60	11.33	56.65	7.33	36.65
30 dias	19.72	98.60	14.66	73.30	9.9	49.50	6.6	33.00
3 meses	13.99	69.95						

Estudio de estabilidad acelerada de NIDEGANICINA en polvo.

$\log k = 2.14 \times 10^{-4}$

$k = 0.0138$

$t_{1/2} = \frac{0.693}{k}$

$t_{1/2} = 43478.26 \text{ horas}$

$t_{1/2} = 1811.59 \text{ días}$

$t_{1/2} = 4.96 \text{ años}$

$t_{1/2} \approx 5 \text{ años}$

Log. R

$1/T^{22}$

Estudio de estabilidad acelerada de HIBROMANOLINA en suspensión.

$k = \text{antilog } 111.25 \times 10^{-4}$

$k = \text{antilog } 0.01112$

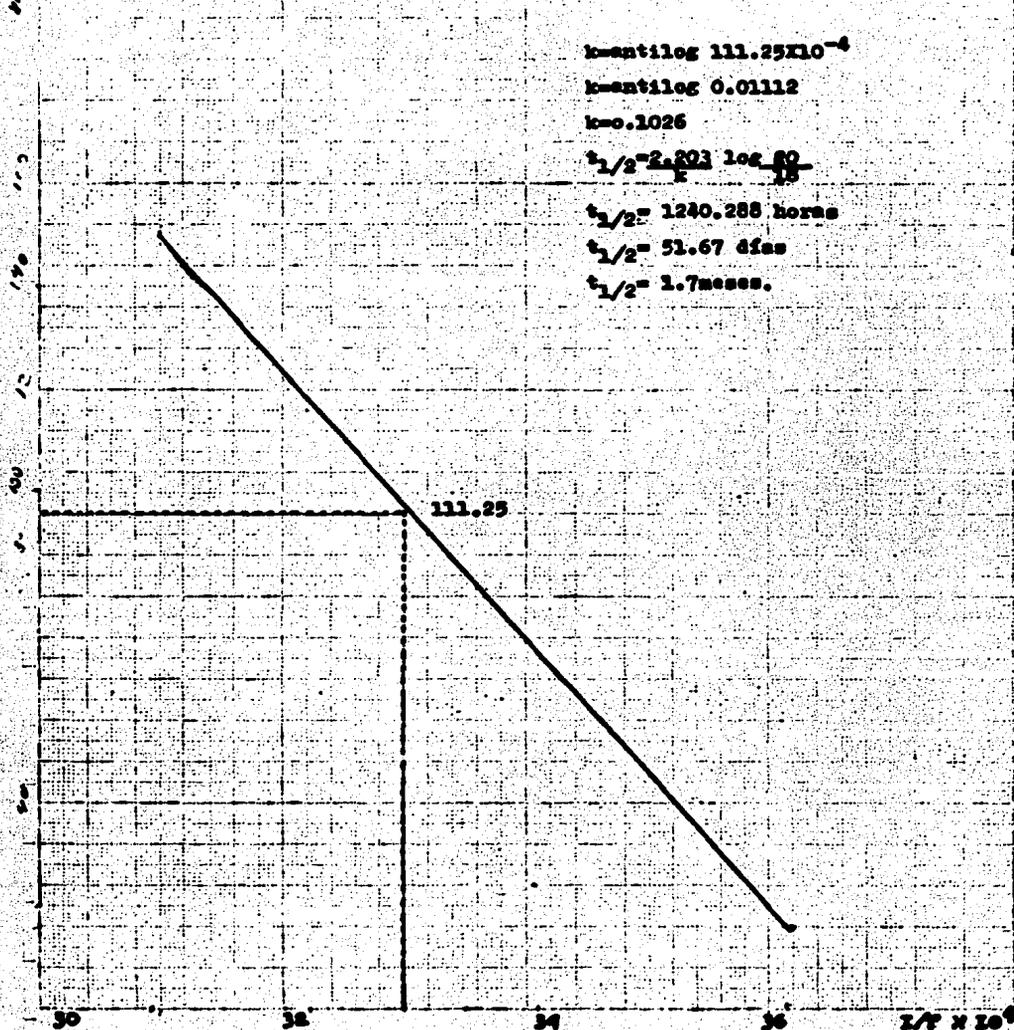
$k = 0.1026$

$$t_{1/2} = 2.303 \log \frac{60}{15}$$

$$t_{1/2} = 1240.288 \text{ horas}$$

$$t_{1/2} = 51.67 \text{ días}$$

$$t_{1/2} = 1.7 \text{ meses.}$$



ESTADISTICA:

Forma Farmacéutica: Cápsulas.

1a. ETAPA

**Para el método de
Penicilindros:**

$$\bar{x} = 200.17$$

$$n = 10$$

$$S = \text{Desviación estándar} = 1.92$$

$$\text{Error estándar} = ES = 0.618$$

Prueba t (student)

$$t = 1.4$$

Límites de confianza o fiduciales

Para el método de Penicilindros:

$$\text{Límite superior} = L_H = 201.85 \text{ mcg./cápsula}$$

$$\text{Límite inferior} = L_L = 198.49 \text{ mcg./cápsula.}$$

Para el método de Sensidiscos:

$$\text{Límite superior} = L_H = 199.98 \text{ mcg./cápsula}$$

$$\text{Límite inferior} = L_L = 197.62 \text{ mcg./cápsula}$$

$$\text{Coeficiente de variación} = cv = 0.95$$

**Para el método de
Sensidiscos:**

$$\bar{x} = 199.3$$

$$n = 10$$

$$S = 1.92$$

$$ES = 0.618$$

$$t = 1.4$$

2a. ETAPA

Para el método de
Penicilindros:

$$\bar{x} = 200.04$$

$$n = 9$$

$$S = 9.7$$

$$ES = 0.87$$

$$\text{Prueba } t \text{ (Student } t) = t = 1.4$$

Para el método de
Sensidiscos:

$$\bar{x} = 198.75$$

$$n = 9$$

$$S = 9.5$$

$$ES = 0.87$$

$$t = 1.4$$

Límites de confianza o fiduciarios;

Para el método de Penicilindros:

$$\text{Límite superior} = L_H = 208.74 \text{ mcg./cápsula.}$$

$$\text{Límite inferior} = L_L = 191.34 \text{ mcg./cápsula.}$$

Para el método de Sensidiscos:

$$\text{Límite superior} = L_H = 208.45 \text{ mcg./cápsula.}$$

$$\text{Límite inferior} = L_L = 190.85 \text{ mcg./cápsula.}$$

$$\text{Coeficiente de variación} = cv = 0.47.$$

ESTADISTICA:

PRESENTACION: Polvo para reconstituir al momento de usarse.

1a. ETAPA

Método de PENICILINDROS:

$$\bar{x} = 1,200.36$$

$$\text{Desviación estándar} = S = 8.6$$

$$\text{Error estándar} = ES = 5.9$$

Prueba de t.

$$t = 0.23$$

Método de SENSIDISCOS:

$$\bar{x} = 1,198.95$$

$$S = 8.6$$

$$ES = 5.9$$

Límites fiduciales o de confianza para el método de PENICILINDROS:

$$\text{Límite superior} = L_H = 1,206.36 \text{ mcg./ml.}$$

$$\text{Límite inferior} = L_L = 1,194.36 \text{ mcg./ml.}$$

Para el método de SENSIDISCOS:

$$L_H = 1,204.93 \text{ mcg./ml.}$$

$$L_L = 1,192.93 \text{ mcg./ml.}$$

$$\text{Coeficiente de Variación} = \text{c.v.} = 0.716.$$

ESTADISTICA.

PRESENTACION: Polvo para reconstituir al momento de usarse.

2a. ETAPA

Método de PENICILINDROS:

Método de SENSIDISCOS:

$$\bar{x} = 1,200.96$$

$$\bar{x} = 1,197.63$$

$$\text{Desviación estándar} = S = 8.6$$

$$S = 8.6$$

$$\text{Error estándar} = ES = 3.3$$

$$ES = 3.3$$

Prueba t (Student).

$$t = 0.09$$

Límites fiduciales o de confianza:

PENICILINDROS:

$$L_H = 1,207.4 \text{ mcg./ml.}$$

$$L_L = 1,194.5 \text{ mcg./ml.}$$

Para el Método de SENSIDISCOS:

$$L_H = 1,204.07 \text{ mcg./ml.}$$

$$L_L = 1,194.5 \text{ mcg./ml.}$$

Coficiente de variación:

$$c.v. = 0.71$$

4. ANALISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico fueron sometidos a la prueba t de students para muestras y se consideró una diferencia significativa a nivel de $p=0.05$; obteniéndose en la prueba valores menores a los establecidos en la tabla para un número igual de muestras analizadas. Por lo que se concluye que al no haber encontrado diferencias significativas, podemos utilizar para la determinación de la potencia de nuestro compuesto, cualquiera de las dos variantes hechas al método de difusión en placa de agar.

El método de determinación química por solventes no acuosos, se recomienda exclusivamente para materia prima y como un método de apoyo al método microbiológico.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las pruebas de estabilidad acelerada para cápsulas y polvo para reconstituir, nos permiten hacer las siguientes conclusiones:

1. Al no sufrir alteraciones en el aspecto del producto, ni en su actividad antimicrobiana, después de tres meses a temperatura de 50°C, se considera como un producto estable aproximadamente dos años a temperatura ambiente.
2. El polvo para reconstituir es estable y se mantiene sin cambio apreciable en el momento de usarse, es comprobado que su actividad antimicrobiana es correcta.
3. Al hacer la reconstitución del producto, la actividad antimicrobiana tiende a bajar, por lo que es recomendable que una vez hecha la reconstitución, ésta debe utilizarse dentro de las dos primeras semanas de su preparación.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Kaneoka T. et al.
Therapeutic effect of SF-837 (MIDECAMICYN) in obstetrics and gynecology. *Clinical Gynecology and Obstetrics*. (1972).
2. Katsu M. et al.
Double blind trial of SF-837 (MIDECAMICYN) in the treatment of respiratory infections.
J. Japanese Association for infectious Diseases (1972).
3. Mayama T., et al.
Biopharmaceutical Studies on Macrolide Antibiotic SF-837 (MIDECAMICYN), Gastrointestinal absorption in dogs and its effect on gastric mucosa in rats.
Yakuzaigaku (1972).
4. Mikuni M. et al.
Basic and clinical evaluation on the efficacy of MIDECAMICYN in the ophthalmology. *CHEMOTHERAPY*. (1973)
5. Nakazawa S. et al.
Some investigation on SF-837 (MIDECAMICYN), A new macrolide antibiotic in the field of pediatrics, *CHEMOTHERAPY*. (1973).
6. Niida T., et al.
A New Antibiotic SF-837
J. Antibiotics 24. (1971).
7. Moniya B. et al.
Microbiological Study with SF-837 (MIDECAMICYN).
Chemotherapy. (1972).
8. Sanbe B. et al.
A clinical study of SF-837 (MIDECAMICYN) in the treatment of infections in the field of otorhinolaryngology.
Medical treatment. (1972)
9. Takahashi H. et al.
A new antibiotic MIDECAMICYN in the treatment of suppurative skin diseases. *CHEMOTHERAPY* (1973).
10. Takeuchi Yonehara
Structure. *Et. Et J. Antibiotics* (1964)

11. Tsuruoka T. et al.
J. Antibiotic. (1971)
12. U.S. Pharmacopeia (1980)
13. U.S. Pharmacopeia-National Formulary 1981.
14. U.S. Pharmacopeia (1984).
15. Weisblum, B. & V. Demohn. J. Bact., (1969)
16. Ymagishi, S., et al.
Japan J. Microbiol, (1971).