

24.4



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
"ZARAGOZA"**

**ESTUDIOS DE FORMULACION DE DOS  
UNGÜENTOS OFTALMICOS DE  
IDOXURIDINA**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MARIA GUADALUPE CASTRO LIMA**





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.

## CONTENIDO

1.	INTRODUCCION	1
2.	ANTECEDENTES DEL PRINCIPIO ACTIVO	3
3.	FUNDAMENTACION DEL TEMA	6
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
5.	OBJETIVO	14
6.	HIPOTESIS DE TRABAJO	14
7.	MATERIAL Y EQUIPO	15
8.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	17
	8.1. Estudios de formulación	18
	8.2. Desarrollo del método de análisis para valorar Idoxuridina	31
	8.3. Evaluación del proceso de mezclado	70
	8.4. Manufactura de ungüentos oftálmicos de Idoxuridina	80
9.	CONCLUSIONES	89
10.	PROPUESTAS	91
11.	ANEXO I	92

12.	ANEXO II	98
13.	BIBLIOGRAFIA	104

## I. INTRODUCCION

Una de las finalidades que se persiguen al administrar medicamentos, es entre otras, la prevención de enfermedades. Sin embargo, existen enfermedades que ocurren naturalmente en el hombre como son aquellas causadas por los virus. Un caso común es la queratitis viral causada por herpes simple, la cual se caracteriza por la inflamación de la cornea y conjuntiva del ojo y es probablemente una de las enfermedades virales que puede ser tratada eficazmente por un fármaco específico el cual actúa inhibiendo la síntesis del ADN viral como lo es la Idoxuridina. Esta puede ser administrada ya sea en solución ó en unguento, siendo éste último el que ofrece mayor ventaja debido a que permanece mayor tiempo en contacto con el área afectada.

Debido a que el ojo carece de mecanismos de defensa inmunológicos y es aún más susceptible a las infecciones cuando se encuentra lesionado, se requiere que los ungüentos así como cualquier producto de uso oftálmico cumpla con el requerimiento de esterilidad establecido en la literatura oficial. En algún tiempo, la producción de ungüentos no era la adecuada, por lo que las autoridades sanitarias se vieron en la necesidad de establecer normas en las que se tomaran los mismos requerimientos observados con los inyectables. Actualmente con las investigaciones y gracias a los avances tecnológicos

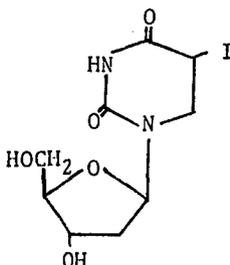
cos, se cuenta con procedimientos adecuados para producir un-  
güentos oftálmicos estériles.

Tomando en cuenta el riesgo que se tiene sobre la salud  
al administrar unguentos contaminados y considerando cada for  
mulación como un sistema diferente es indispensable realizar  
estudios piloto para establecer los métodos de manufactura ,  
de análisis, así como pruebas de control para obtener una for  
ma farmacéutica segura y eficaz.

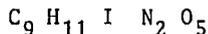
## 2. ANTECEDENTES DEL PRINCIPIO ACTIVO

La Idoxuridina es un agente antiviral utilizado eficazmente contra el Herpes simple. Su efectividad radica en el hecho de que su estructura se asemeja a la molécula de timidina que se requiere para la síntesis del ADN viral. La Idoxuridina se sintetizó en 1959 por Prusoff y después de ésta fecha se dieron a conocer estudios sobre sus propiedades químicas y físicas, estudios clínicos y farmacológicos (1).

Estructura :



Fórmula condensada:



Peso molecular:

354.10

Nombre químico:

2'-desoxi-5-iodouridina

Descripción:

Polvo cristalino blanco sin olor

Punto de fusión:

180-185 °C con descomposición

Solubilidad

1 parte en 500 de agua, 1 en 400 de alcohol etílico, 1 en 230 de alcohol metílico, insoluble en éter y cloroformo

Estabilidad:

En soluciones acuosas, la Idoxuridina se hidroliza en productos

que dependen de las condiciones de almacenamiento. La degradación obedece a una catálisis específica ácido-básica; observándose mayor estabilidad a un pH entre 2 y 6 . En medio sólido, la Idoxuridina es estable bajo la mayoría de las condiciones (2).

Los productos de degradación que se originan en medio ácido como el Iodouracilo son más tóxicos que la Idoxuridina reduciendo su actividad antiviral, por lo que las soluciones se almacenan en recipientes bien cerrados y protegidos de la luz (3,4).

**Efectos tóxicos:**

Aunque la Idoxuridina puede ser tolerada, en ocasiones se presentan efectos tóxicos como comezón, edema, fotofobia, inflamación. No se administra cuando hay ulceraciones profundas en la cornea, ni cuando se administran corticosteroides. Su uso no debe exceder más de 4 días (5, 29).

**Presentaciones:**

**Ungüento al 0.5 %**

**Solución al 0.1 %**

### 3. FUNDAMENTACION DEL TEMA

De los medicamentos destinados al uso oftálmico, las formas farmacéuticas más comúnmente utilizadas son las soluciones y los ungüentos, cuya actividad terapéutica puede ser administrando agentes anti-inflamatorios, agentes anti-microbianos ó anestésicos (6).

Los oftálmólogos han optado por preferir los ungüentos más que las soluciones oftálmicas, debido a que son mejor tolerados y aumentan el tiempo de retención fármaco-conjuntiva. Los ungüentos oftálmicos se administran alrededor y dentro del ojo por lo que se requiere de materiales especiales para su elaboración y se debe tomar precauciones para su manufactura de tal manera que se obtenga un producto estéril. El concepto de esterilidad para éstas formas farmacéuticas se introdujo en algunos compendios oficiales europeos en 1964, después de una serie de estudios en los que se reportaron se veras infecciones en ojos de pacientes que se administraron (7, 30).

Por tanto, los ungüentos oftálmicos son formas farmacéuticas que deben cumplir con los requerimientos de esterilidad establecidos por la literatura oficial, la importancia del concepto de esterilidad se debe a que la cornea, sitio de administración del ungüento, no posee mecanismos de defensa inmunológicos, además de que, es un medio óptimo para el crecimiento de microorganismos patógenos como Pseudomona ae-

ruginosa. Este microorganismo se adapta fácilmente y sobrevive con pocos requerimientos nutritivos; su efecto destructivo sobre la cornea se debe a que produce una enzima colagenolítica (8).

El método ideal para la manufactura de ungüentos oftálmicos es esterilizar el producto en su envase final; esto es posible mediante la radiación gama de Cobalto 60, el poder ionizante de éste tipo de radiación reduce ó inhibe totalmente la reproducción de microorganismos que pudieran estar presentes en el producto ó envase; sin embargo, éste método es prohibitivo debido a su costo elevado, además de que podrían ocurrir descomposiciones químicas del principio activo en la formulación. Puede utilizarse métodos de esterilización por calor seco ó calor húmedo del producto en el empaque adecuado para su dispensación como tubos colapsibles de aluminio, estaño ó plástico, pero no es un método adecuado, debido a la inestabilidad del principio activo, a la naturaleza del mismo material de empaque y a la misma formulación (9).

En la práctica, los ungüentos oftálmicos se preparan esterilizando por métodos convencionales cada una de las materias primas, la fabricación se realiza en áreas especialmente diseñadas con características arquitectónicas en las que los cuartos de trabajo están provistas de aire purificado, los techos, los pisos, paredes y mesas de trabajo son de superficies lisas; evitándose materiales porosos con grietas ó hendiduras.

duras.. El personal altamente calificado y entrenado para el manejo de técnicas asépticas, debe portar vestimenta es téril; el principio activo puede esterilizarse por calor seco si éstos no son termolábiles; si son solubles en agua, la esterilización se efectua por filtración ó bien, si no son adecuados éstos métodos, la esterilización puede ser mediante Oxido de etileno (10,11).

Las materias primas utilizadas como excipientes en la formulación de ungüentos oftálmicos no deben causar reacciones a lérgicas ó malestar al ojo, generalmente se utilizan bases que contienen petrolato, aunque también se han utilizado bases blandas de absorción (lanolina), bases solubles en agua (como las preparadas con polietilenglicol ó gomas solubles en agua), bases simples como aceite mineral, ceras ó soluciones acuosas de pectina y metilcelulosa ó bien bases compuestas tipo emulsión (12, 7).

Otra base convencional es la preparada con aceite mineral y polietileno de peso molecular de 21 000, llamada "base plás tica", ésta base es un semisólido estable y puede ser incorporada fácilmente con la mayoría de los fármacos (13).

Se han realizado estudios con el objeto de introducir otro tipo de bases para posible uso oftálmico, utilizando como materias primas polímeros no emulsificables de alto peso molecular, estearato de magnesio, gel de sílica y disolventes no polares, cabe señalar que en éstos estudios no se efectuaron pruebas biológicas tales como la de irritabilidad en el ojo (14, 15).

En la literatura se reporta una gran variedad de materias primas para la formulación de ungüentos oftálmicos, sin embargo se consideran como una guía para el trabajo experimental, ya que la elección depende principalmente de las características fisicoquímicas del principio activo. De las bases mencionadas anteriormente, las que contienen petrolato ofrecen las ventajas de ser químicamente inertes, anhidras, neutras, no se arrancian, no irritan el ojo y pueden ser esterilizadas por calor seco (16).

Los ungüentos oftálmicos incluyen en su formulación conservadores ó mezclas de conservadores. Estos deben ser efectivos contra Pseudomona aeruginosa, microorganismos gram positivos y gram negativos, hongos y levaduras. Se utilizan en pequeñas concentraciones, deben ser estables, compatibles con el fármaco y demás componentes de la formulación, no deben causar irritación ni sensibilidad al ojo (17).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El farmacéutico contribuye en áreas relacionadas con las ciencias de la salud, siendo una de sus funciones, el desarrollo de formas farmacéuticas que permitan la prevención y tratamiento de enfermedades. Así éste profesional aplica sus conocimientos en la formulación, el desarrollo de métodos de análisis y en aspectos relacionados con procesos de manufactura entre otros; para obtener un producto seguro y eficaz.

El presente trabajo tiene por objeto efectuar estudios de formulación para dos ungüentos oftálmicos que contienen Idoxuridina. Estos estudios consisten entre otros, a la recopilación de información bibliográfica, a la determinación de la cantidad de excipientes y al desarrollo de un método de análisis de Idoxuridina para utilizarlo como método de control durante el proceso de manufactura.

De acuerdo con las características fisicoquímicas y estudios de estabilidad de la Idoxuridina frente a bases tradicionales como las de petrolato, se utilizarán las siguientes:

Base de polietileno-aceite mineral. Esta base es una mezcla que forma un gel semisólido, donde el polietileno de baja densidad es el responsable de la estructura del gel, por lo que se puede variar su cantidad para obtener una base estable, sin separación del componente oleoso (27).

Base de petrolato sólido, cera de abeja y aceite mineral. Esta base es una mezcla de petrolato sólido, cera de abeja y

aceite mineral. El petrolato es un gel semisólido constituido por un componente líquido oleoso y un componente de cera, la cual es la responsable de la rigidez y estabilidad de la estructura del gel. Dicha estructura puede ser modificada de tal manera que se obtenga una base en la que no ocurra una separación del componente oleoso adicionando cera de abeja y que además, la adición de aceite mineral permita disminuir la viscosidad del petrolato, lo que origina una preparación blanda cuya temperatura de fusión sea cercana a la temperatura corporal (28).

Como conservadores, se utiliza una mezcla de metil y propilparabeno, cuya actividad es evaluada por la prueba de efectividad conservadora (18, 31, 32).

De acuerdo con los recursos económicos con los que se cuenta y con las características de las bases y métodos de manufactura, se propone preparar lotes de ungüentos con Idoxuridina en condiciones asépticas a nivel piloto; esterilizando por separado materias primas y utilizando equipo esterilizado, en una área provista de una campana de aire de flujo laminar. La evaluación del proceso de fabricación se realizará mediante la prueba de esterilidad.

También es necesario evaluar variables sobre el proceso de fabricación, como lo es determinar el tiempo de mezclado que asegure la uniformidad del principio activo en la mezcla. El criterio utilizado para determinar la uniformidad en el

mezclado de ungüentos, es evaluar cuantitativamente uno de los componentes a diferentes tiempos de mezclado, por lo que se hace necesario contar con un método de análisis para cuantificar Idoxuridina.(19, 33, 34).

El método de análisis para valorar Idoxuridina reportado en la literatura oficial, se refiere a un método por cromatografía en columna líquido-líquido, éste método permite valorar Idoxuridina apartir de sus productos de degradación y en presencia de otros componentes; el soporte utilizado para la columna, es material de importación, además de que se requiere de un volumen de 200 ml de disolvente orgánico utilizado como eluyente(20).

Para las soluciones oftálmicas, aparte del método farmacopeico, la literatura reporta un método para valorar Idoxuridina y sus productos de degradación, el cual se refiere a una cromatografía de líquidos de alta resolución. Se reporta también un método por cromatografía en capa fina para separar la Idoxuridina de sus productos de degradación (21).

Existen los reportes de métodos para analizar Idoxuridina basados en reacciones químicas entre el grupo -CONHCO- de la molécula de Idoxuridina y cobalto para formar un color azul violeta;ó bien, la molécula de ribosa de la Idoxuridina reacciona con cistefna en ácido sulfúrico para producir un color rosa (22, 23).

Debido a la crisis económica por la que atraviesa el país

no es posible disponer de materias de importación ni de equipo de alto costo. Por lo tanto, se propone establecer un método de análisis para valorar Idoxuridina por extracción con disolventes y se cuantifica midiendo su absorción espectrofotométrica. Para confiar en el método de análisis propuesto, se evaluará la exactitud, precisión, especificidad y linealidad, a partir de los resultados obtenidos experimentalmente.

## 5. OBJETIVO

Realizar estudios de formulación de dos ungüentos oftálmicos de Idoxuridina a nivel piloto, para establecer los métodos de manufactura de éstas formas farmacéuticas destinadas al sector salud.

## 6. HIPOTESIS DE TRABAJO

- Durante la formulación de ungüentos oftálmicos con Idoxuridina, se establecerán las cantidades de excipientes utilizadas como bases.

- Se comparan y se selecciona una de las bases propuestas para la producción del ungüento de Idoxuridina en función de sus características físicas, del método de manufactura y en función del método de análisis de Idoxuridina.

## 7. MATERIAL Y EQUIPO

### 7.1. Materias primas

Petrolato sólido blanco grado farmacéutico

Aceite mineral grado farmacéutico

Cera de abeja grado farmacéutico

Polietileno de baja densidad " PX20020-P "

Idoxuridina USP

Metilparabeno USP

Propilparabeno USP

Tween 80 USP

Cloruro de benzalconio grado farmacéutico

Miristato de isopropilo grado farmacéutico

### 7.2. Reactivos

Acido clorhídrico R.A.

Eter etílico R.A.

Eter de petróleo R.A.

Fenol R.A.

Cloruro de sodio

### 7.3. Medios de cultivo

Agar nutritivo

Caldo de tioglicolato-caseína

### 7.4. Equipo

Mezclador planetario "Erweka" AR4000

Agitador de propela " Caframo "  
Parrila de calentamiento  
Estufa de secado " Riossa" HB  
Espectrofotómetro de doble Haz " Beckman "  
Autoclave  
Campana de flujo de aire laminar  
Equipo " Sartorius " para pruebas de esterilidad  
Balanza analítica Monoplate "Mettler"  
Balanza granataria

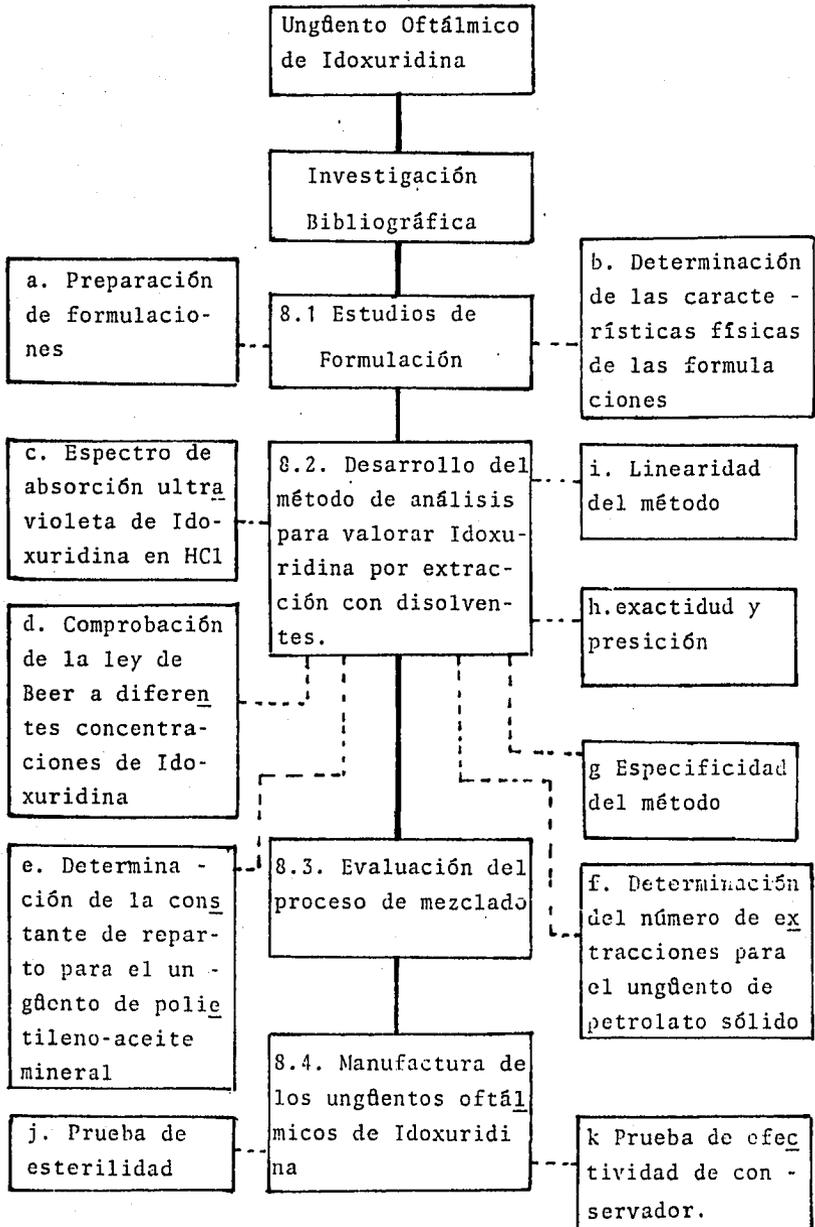
7.5. Material de vidrio

Embudos de separación de 250 ml  
Embudos de filtración rápida  
Matraces volumétricos de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1 000 ml  
Vasos de precipitados  
Probetas  
Tubos de ensayo  
Tubos bacteriológicos  
Cajas de petri  
Pipetas graduadas de 1 ml

7.6. Otros

Soportes  
Gradillas  
Pinzas  
Mangueras de hule látex

## 8. DESARROLLO EXPERIMENTAL



## 8.1. Estudios de formulación

### Experimento No.1

Preparación de las formulaciones y determina  
ción de sus características físicas.

Objetivo: Preparar las formulaciones de los ungüentos variando la cantidad de polietileno para la base de polietileno-aceite mineral y variando la cantidad de cera y aceite mineral para la base de petrolato, con el objeto de seleccio  
nar las formulaciones más adecuadas en fun -  
ción a sus características físicas tales como:  
aparencia, características organolépticas,  
intervalo de fusión, consistencia y estabili  
dad física.

Procedimiento de manufactura.

Ungüento de Idoxuridina. Base de polietileno-aceite mine-  
ral.

1. Esterilizar el polietileno y aceite mineral a 140 °C durante 3 horas.
2. Disolver el polietileno en el aceite mineral a 140°C , manteniendo agitación rápida.
3. Bajar la temperatura de la mezcla a 95 °C y enfriar ra  
pidamente sobre una superficie fría.
4. Transferir el semisólido a un mezclador planetario, a-  
dicionar la Idoxuridina y mezclar por 5 minutos a 21 R.P.M.,

adicionar la mezcla de conservadores y mezclar durante 10 minutos a 21 R.P.M. a temperatura ambiente.

Observaciones : En la preparación de ésta base, se requiere que el polietileno se disuelva en el aceite mineral a temperatura elevada, una vez disuelto se permite que la mezcla se enturbie para que rapidamente se enfrie la mezcla. La explicación a éste procedimiento se debe a que el polietileno actua como agente gelificante que precipita al enfriarse rapidamente, formandose de ésta manera un gel semisólido. La concentración mínima de polietileno es del 5 %. al aumentar la cantidad, se obtiene un semisólido más resistente (24).

Fórmula No. 1

Polietileno	5 %
Aceite mineral	95 %
Idoxuridina	0.5 %
Metilparabeno	0.03 %
Propilparabeno	0.01 %

Fórmula No. 2

Polietileno	6 %
Aceite mineral	94 %
Idoxuridina	0.5 %
Metilparabeno	0.03 %
Propilparabeno	0.01 %

Fórmula No. 3

Polietileno	7 %
Aceite mineral	93 %
Idoxuridina	0.5 %
Metilparabeno	0.03 %
Propilparabeno	0.01 %

Procedimiento de manufactura.

Ungüento de Idoxuridina. Base de petrolato sólido, aceite mineral y cera de abeja.

1. Esterilizar el petrolato sólido junto con la cera de abeja a 140 °C durante 3 horas.

2. Distribuir el aceite mineral en otro recipiente y esterilizar a 140 °C durante 3 horas.

3. Filtrar en caliente el petrolato y cera de abeja a través de papel filtro de poro abierto.

4. Transferir la mezcla a un mezclador planetario y agitar a 27 R.P.M. a la temperatura de 80 °C.

5. A la temperatura de 60 °C, cambiar la agitación a 20 R.P.M. para evitar excesiva incorporación de aire.

6. Dispersar la Idoxuridina y mezcla de conservadores en el aceite mineral.

7. Adicionar la mezcla anterior a la base, a la temperatura de 50 °C (para ambas mezclas).

8. Mezclar durante 15 minutos a la velocidad de mezclado de 20 R.P.M.

Observaciones: La dispersión de los sólidos directamente en la base, originó aglomerados de partículas que se apreciaron a simple vista. Por lo que el principio activo y conservadores se adicionaron con un agente dispersante. El uso de polietilenglicol no dió resultado ya que se observó una fase de separación. Se utilizó entonces el mismo aceite mineral.

Este procedimiento fué empleado para la fabricación de los ungüentos en estudio, utilizando las siguientes fórmulas :

Fórmula 'A'

Cera de abeja	3 %
Aceite mineral	10 %
Petrolato sólido	86.45 %
Idoxuridina	0.5 %
Metilparabeno	0.03 %
Propilparabeno	0.01 %

Fórmula 'B'

Cera de abeja	5 %
Aceite mineral	8 %
Petrolato sólido	86.46 %
Idoxuridina	0.5 %
Metilparabeno	0.03 %
Propilparabeno	0.01 %

Fórmula 'C'

Cera de abeja	6 %
Aceite mineral	7 %
Petrolato sólido	86.46 %
Idoxuridina	0.5 %
Metilparabeno	0.03 %
Propilparabeno	0.01 %

Métodos de análisis para evaluar las características físicas de los ungüentos.

Apariencia. Distribuir una porción de ungüento en un papel adsorbente mediante una espátula. No debe observarse fases de separación ni aglomerados de partículas (25).

Características organolépticas. Describir el color y olor de las formulaciones.

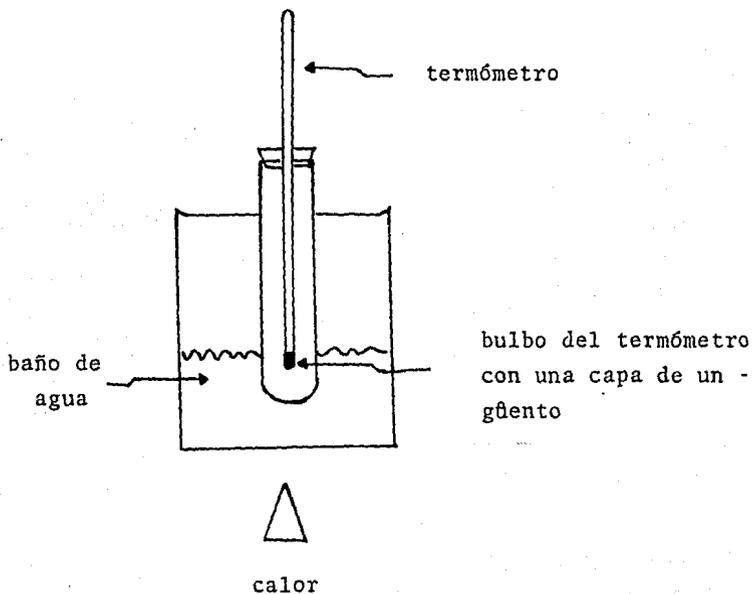
Temperatura de fusión. USP XIX, p. 961.

Fundir una cantidad de ungüento hasta alcanzar la temperatura de 90-92 ° C. Enfriar el ungüento a 47 °C. Introducir el bulbo frío de un termómetro al ungüento fundido .

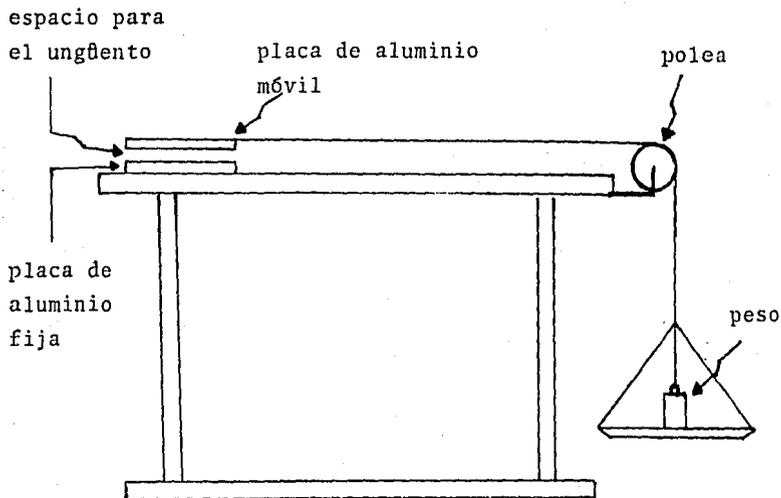
Fijar el termómetro con la capa de ungüento en el bulbo, a un tubo de ensayo (como se muestra en la figura ). Colocar el tubo de ensayo con el termómetro en un baño de agua a la temperatura de 16 °C. Aumentar la temperatura del baño 2 °C

por minuto hasta alcanzar la temperatura de 30 °C. Aumentar la temperatura del baño a 41 °C y anotar la temperatura a la cual se desprende la primera gota del termómetro.

Se esquematiza a continuación el equipo utilizado en esta prueba.



Consistencia . El equipo utilizado para ésta prueba se esquematisa de la manera siguiente :



Procedimiento: Colocar entre las dos placas el ungüento. Descansar sobre las placas una pesa de 1 Kg durante 5 minutos, para obtener una capa de ungüento uniforme y para sacar el aire entre las placas. Sujetar la placa superior a un determinado peso y anotar el tiempo requerido para que las dos placas se separen. (26).

Estabilidad física . Llenar frascos ampulla y tubos colapsables de aluminio con las diferentes formulaciones, almacenarlas a las temperaturas de : 35 °C, 45 °C, 60 °C y refrigerador para generar el fenómeno de "lagrimeo" . Los tubos y frascos se ciclan, de tal manera que permanecen a tem

peratura ambiente durante el día y por la noche a las temperaturas especificadas anteriormente durante un período de 10 días.

Esparcir una cantidad de unguento en estudio, sobre un papel filtro, antes y después de someterlos a las diferentes temperaturas. Medir el halo que forma en el papel filtro alrededor del unguento.

Observaciones: Para las formulaciones de polietileno-aceite mineral, se verificó visualmente la presencia ó ausencia de alguna fase de separación.

La Idoxuridina , el metil y propilparabeno se micronizaron antes de ser incorporados a las formulaciones.

Tabla 1 Descripción de las formulaciones	
<u>Formulación</u>	<u>Características organolépticas y apariencia</u>
No. 1	Ungüento blanco, sin olor, no se observó fase de separación ni aglomerados de partículas
No.2 y No.3	Ungüentos blancos, sin olor, no se observó fase de separación ni aglomerado de partículas.
'A', 'B', y 'C'	Ungüentos blancos, de olor característico al petrolato sólido, sin ningún aglomerado de partículas, ni fase de separación.

Tabla 2 Temperatura de fusión(promedio de 5 determinaciones).	
<u>Formulación</u>	<u>Temperatura °C</u>
No. 1	90
No. 2	91
No. 3	mayor a 100
'A'	59.3
'B'	61.6
'C'	62.6

Tabla 3 Tiempo que tarda en desplazarse la placa móvil de la placa fija separadas por una capa de unguento como medida de la consistencia (5 determinaciones)

<u>Formulación</u>	<u>carga (gr)</u>	<u>Tiempo (seg)</u>
No. 1	90*	12' 50"
	"	11'
	"	11'
	"	10' 80"
	"	12' 80"
No. 2	90	15' 40"
	"	17' 50"
	"	18' 40"
	"	18' 40"
	"	17' 40"
No. 3	90	Después de 1 minuto no se observó separación de las placas
'A'	50 **	10' 02"
	"	10' 02"
	"	9' 06"

	"	10' 04"
	"	9' 02"
'B'	50	13' 08"
	"	10' 40"
	"	12'
	"	13' 04"
	"	13'
'C'	50	16'
	"	15' 03"
	"	18' 02"
	"	15' 06"
	"	15'
Petrolato sólido	50	Después de un minuto no se observó separa ción de placas

\*Nota: Para las formulaciones 1,2, y 3, una carga menor de 90 gr no permite el desplazamiento de la placa móvil.

\*\*Nota: Para las formulaciones A,B, y C , una carga menor de 50 gr no permite el desplazamiento de la placa móvil.

Tabla 4 Resultados de los estudios de estabilidad física de los ungüentos almacenados durante 10 días.

<u>Formulación</u>	<u>Temperatura de almacenamiento : 35°C, 45 °C, 60 °C y refrigerador.</u>
No. 1	Presentó fase de separación 24 horas después de su preparación.
No. 1' y No. 2	A simple vista no presentaron fase de separación.
'A', 'B', y 'C'	No se observó ninguna fase de separación.

Tabla 5 Distancia de separación observada al esparcir una porción de ungüento sobre papel filtro para las formulaciones que contienen petrolato sólido almacenadas durante 10 días. Temperatura: 35°C, 45°C, 60°C, refrigerador.

<u>Formulación</u>	<u>Distancia inicial (mm)</u>	<u>Distancia final (mm)</u>
'A'	2.5	2.5
'B'	1	1
'C'	menor de 1	menor de 1
Petrolato sólido	1	1

## Discusión de los resultados .

1.- Se seleccionó la formulación No. 2 , en la cual no se observó ninguna fase de separación y en base a que presentó menor tiempo en comparación a la formulación No. 3, según el criterio establecido para evaluar la "consistencia". La formulación contiene: polietileno al 6%, aceite mineral al 94 % , Idoxuridina al 0.5 % , Metilparabeno al 0.03 % , Propilparabeno al 0.01 % .

2.- De las formulaciones 'A', 'B', 'C', No se observó separación de fases, sin embargo, el 'halo' que se forma al esparcir una porción de unguento en un papel filtro, es mayor para la formulación 'A' en comparación con la formulación 'B', 'C' y el mismo petrolato. Se seleccionó la formulación 'B' ya que presentó menor tiempo en comparación con la formulación 'C' y el petrolato sólido, según el criterio establecido para evaluar la "consistencia" . La formulación contiene: cera de abeja al 5 % , aceite mineral al 8 % , petrolato sólido al 86.46 % , Idoxuridina 0.5 % , Metilparabeno al 0.03 % , Propilparabeno al 0.01 % .

## 8.2 Desarrollo del método de análisis para valorar Idoxuridina

### Experimento No. 2

Espectro de absorción Ultravioleta para la Idoxuridina en una solución 0.2 N de ácido clorhídrico.

Objetivo: Determinar la longitud de onda de máxima absorción de una solución de Idoxuriidina en medio ácido, a la cual se registrarán las lecturas de pruebas posteriores.

#### Procedimiento

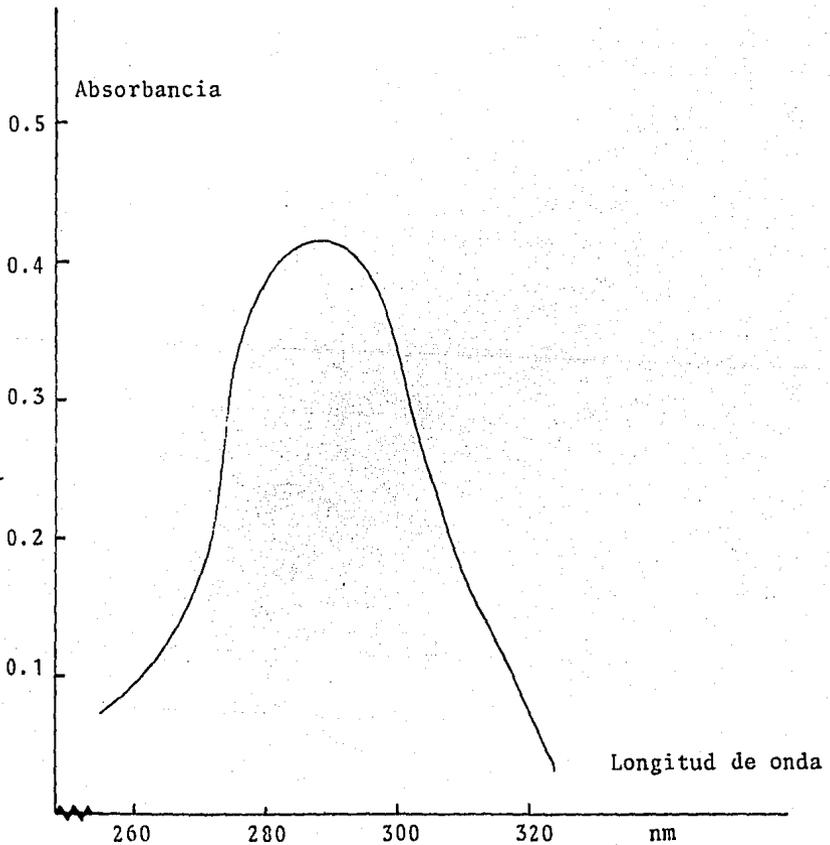
Se pesan exactamente 25 mg de Idoxuridina previamente secada en vacío a 50 °C. Se diluye a un volumen de 50 ml con solución 0.2 N de ácido clorhídrico. Se transfiere una alícuota de 10 ml de ésta solución a un matraz aforado de 250 ml, aforando con la misma solución 0.2 N de ácido clorhídrico. Se corrre el espectro de absorción ultravioleta de 260 a 310 nanómetros.

El blanco lo constituye la solución 0.2 N de ácido clorhídrico.

#### Resultado

Como lo indica la figura No. 1, el pico de máxima absorción ocurre a la longitud de onda de 289 nm.

Gráfica # 1. Espectro de absorción Ultravioleta de Idoxuridina en solución 0.2 N de ácido clorhídrico.



### Experimento No. 3

Comprobación de la ley de Beer a diferentes concentraciones de Idoxuridina en medio ácido.

Objetivo: Determinar la absorbancia de las soluciones a diferentes concentraciones de Idoxuridina en medio ácido para construir una gráfica que demuestre linealidad entre absorbancia y concentración.

#### Procedimiento.

Se preparan por duplicado una solución que contenga 25 mg de Idoxuridina en 100 ml de una solución 0.2 N de ácido clorhídrico, apartir de ésta solución concentrada se efectúan diluciones para tener concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 µcg/ml. Se mide la absorbancia de éstas diluciones a 289 nm. El blanco consiste de solución 0.2 N de ácido clorhídrico.

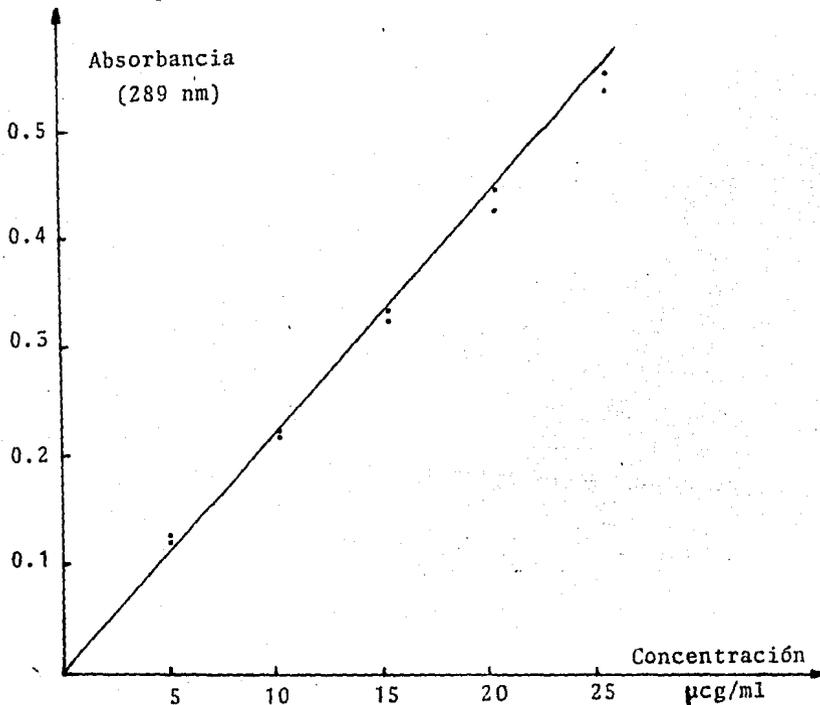
Resultados

Tabla 6. Absorbancias medidas a 289 nm para diferentes concentraciones de Idoxuridina en solución 0,2 N de HCl.

<u>Concentración (µcg/ml)</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>
5	0.108
	0.111
10	0.215
	0.217
15	0.323
	0.329
20	0.427
	0.44
25	0.533
	0.548

Como lo indica la gráfica # 2 y el valor del coeficiente de correlación lineal, existe linealidad entre el rango de concentración de 5 µcg/ml a 25 µcg/ml.

Gráfica # 2 . Absorbancias obtenidas de diferentes concentraciones de Idoxuridina en una solución 0.2 N de ácido clorhídrico ( resultados que corresponden a la tabla No. 6).



Ordenada al origen = 0.00125

pendiente = 0.02159

Coefficiente de correlación r = 0.99903

#### Experimento No. 4

Determinación de la constante de reparto del unguento que contiene base de polietileno-aceite mineral.

Objetivo: Determinar la constante de reparto experimental de la base de polietileno-aceite mineral para calcular el número de extracciones que hagan cuantitativa la extracción.

Procedimiento.

Se pesan exactamente y por duplicado las siguientes cantidades de Idoxuridina: 2.5 mg, 3.5 mg, 5.0 mg, 6.25 mg, 7.5 mg, adicionando a cada una de éstas cantidades metilparabeno (0.3 mg), propilparabeno (0.1 ), y 1 gr de base de polietileno-aceite mineral.

Se disuelve cada uno de los problemas con 40 ml de éter de petróleo y se transfiere la mezcla a un embudo de separación. Se extrae la Idoxuridina de la fase orgánica con una sola porción de 40 ml de una solución 0.2 N de ácido clorhídrico; agitando en sentido vertical durante 1 minuto. El extracto acuoso se lleva a un matraz volumétrico de 250 ml, aforando al volumen con solución 0.2 N de ácido clorhídrico.

Para las soluciones testigo, se pesan exactamente las mismas cantidades de Idoxuridina que se pesan para los problemas,

transfiriendo cada cantidad a matraces volumétricos de 250 ml y aforando al volumen con solución 0.2 N de ácido clorhídrico. Las concentraciones testigo equivalen a: 10, 15, 20, 25 y 30 µcg/ml. Las soluciones que contienen Idoxuridina se protegen de la luz y se filtran antes de medir su absorbancia. Se mide la absorbancia de las soluciones problema y testigos a 289 nm; la diferencia de éstas lecturas proporciona la absorbancia de la fase orgánica.

### Resultados

Tabla 7. Absorbancias de los extractos acuosos y de las soluciones testigo.

Concentración (µcg/ml)	Absorbancia (289 nm) Solución testigo	Absorbancia (289nm) Problema
10	0.214	0.203 0.199
15	0.325	0.298 0.299
20	0.427	0.384 0.392
25	0.55	0.480 0.488
30	0.65	0.593 0.590

Tabla 8. Absorbancias de los extractos orgánicos como resultado de la diferencia de la absorbancia de la solución testigo y la absorbancia de los extractos acuosos.

Concentración ( $\mu\text{cg/ml}$ )	Absorbancia (289 nm)	Absorbancia (289 nm)
	<u>extractos acuosos</u>	<u>extractos orgánicos</u>
10	0.203	0.011
	0.199	0.015
15	0.298	0.027
	0.299	0.026
20	0.384	0.043
	0.392	0.035
25	0.48	0.05
	0.488	0.042
30	0.593	0.057
	0.59	0.06

#### Discusión de los resultados.

##### 1.- Cálculo de la constante de distribución (Kd)

Al extraer la Idoxuridina de la fase orgánica, se considera que se efectúa una extracción "inversa simple"; donde los resultados de absorbancia de la fase acuosa se grafican en función de la absorbancia en la fase orgánica. El valor

de la pendiente de la línea recta representa la constante de distribución. Las fórmulas utilizadas para calcular la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación lineal se describen en el Anexo No. I.

- a).- Valor de la pendiente (Kd) : 8.37
- b).- Valor de la ordenada al origen : 0.086
- c).- Coeficiente de correlación : 0.95

## 2.- Cálculo del rendimiento de extracción.

El rendimiento de extracción se calcula como:

$$R \% = q (100)$$

donde "q" es:

$$q = \frac{\text{Cantidad de soluto en la fase acuosa}}{\text{Cantidad total de soluto}}$$

y "q" se calcula como:

$$q = \frac{1}{Kd \frac{V \text{ org.}}{V \text{ ac.}} + 1}$$

donde :

Kd es la constante de distribución = 8.37

V org. es volumen en la fase orgánica = 40 ml

V ac. es volumen en la fase acuosa = 40 ml

Por tanto, para una extracción con volúmenes iguales de las dos fases:

$$q = 0.893$$

$$R = 89.3 \%$$

Si se reduce el volumen de extractante, el rendimiento de extracción se favorece. Así, para un volumen de 15 ml de la solución 0.2 N de ácido clorhídrico como fase acuosa:

$$q = 0.943$$

$$R = 94.3 \%$$

### 3.- Cálculo del número de extracciones.

Para un rendimiento del 99.9 % de extracción y un volumen de extractante de 15 ml, el número de extracciones se calcula como :

$$R \% = (1 - p^n) 100$$

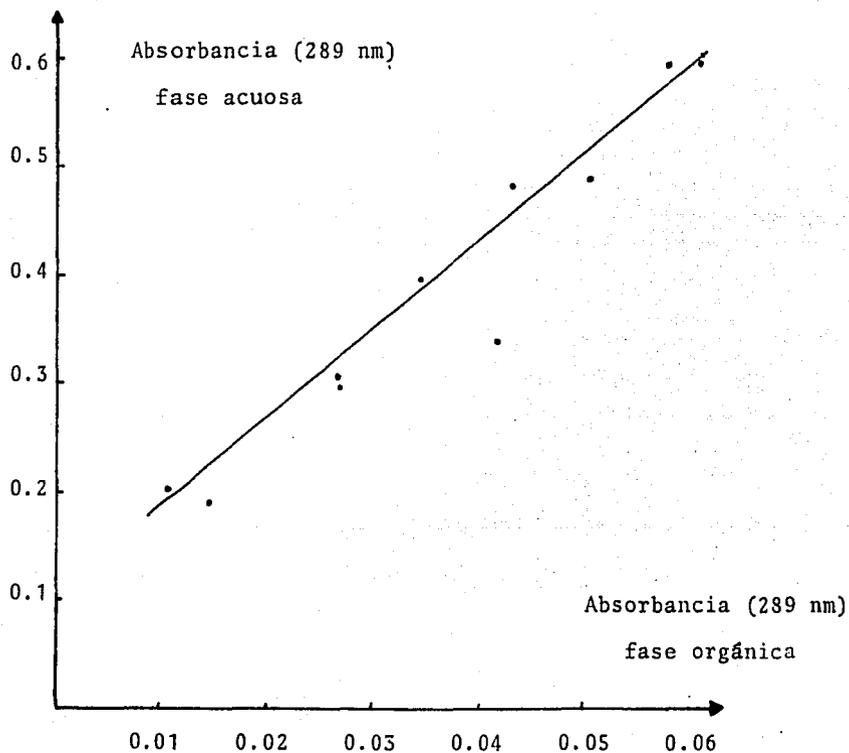
donde "p" es:  $p = 1 - q = 0.058$

"n" es el número de extracciones :

$$n = 2.4 \text{ extracciones}$$

De acuerdo con el Kd determinado experimentalmente y variando el volumen de extractante, se requiere de 3 extracciones de 15 ml de solución 0.2 N de ácido clorhídrico para lograr un 99.9 % de rendimiento en la extracción.

Gráfica # 3. Absorbancia de Idoxuridina en la fase acuosa y en la fase orgánica para la determinación del Kd (resultados que corresponden a la tabla 8).



Ordenada al origen = 0.086

Pendiente = 8.37

Coefficiente de corre-

lación  $r = 0.95$

Ecuación de la recta  $Y = 0.096 + 8.37 (X)$

## Experimento No. 5

Determinación del número de extracciones para cuantificar Idoxuridina contenida - en la base de petrolato sólido.

Objetivo: Variar el volumen de extractante para determinar el número de extracciones necesarias para cuantificar Idoxuridina - de la base de petrolato sólido.

### Procedimiento

Se pesan exactamente para cada prueba 5 mg de Idoxuridina, 0.3 mg de metilparabeno, 0.1 mg de propilparabeno y 1 g de base.

Los sólidos se mezclan con la porción de base fundida; - una vez solidificada la mezcla, ésta se disuelve con 35 ml de éter etílico y se transfiere a un embudo de separación. Se - extrae la Idoxuridina utilizando los siguientes volúmenes extractantes :

1º 4 porciones de 25 ml de solución 0.2 N de HCl

2º 4 porciones de 40 ml de solución 0.2 N de HCl

3º 5 porciones de 40 ml de solución 0.2 N de HCl

Los extractos acuosos se recuperan en un matraz volumétrico de 250 ml, aforando al volumen con solución 0.2 N de ácido clorhídrico; se mide la absorbancia a 289 nm. Se prepara -

una solución testigo de concentración 20 µcg/ml de Idoxuridina. El blanco consiste de solución 0.2 N de ácido clorhídrico.

El % de recobro de Idoxuridina se calcula mediante la siguiente relación:

$$\% \text{ de Recobro} = \frac{\text{Absorbancia solución problema}}{\text{Absorbancia solución testigo}} \times 100$$

#### Resultados

Tabla 9. Porcentaje de Idoxuridina recuperada utilizando 4 porciones de 25 ml de volumen extractante.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
1	0.376	89.3111
2	0.355	84.3230
3	0.375	89.0736
4	0.350	83.1353
5	0.387	91.9239
6	0.401	95.2494
Solución testigo	0.421	

Tabla 10. Porcentaje de Idoxuridina recuperada utilizando 4 porciones de 40 ml de volumen extractante.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
1	0.405	96.1995
2	0.389	92.599
3	0.388	92.1615
4	0.387	91.9239
5	0.388	92.1615
6	0.387	91.9239
Solución testigo	0.421	

Tabla 11. Porcentaje de Idoxuridina recuperada utilizando 5 porciones de 40 ml de volumen extractante.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
1	0.416	98.5781
2	0.423	100.2369
3	0.421	99.7630
4	0.416	98.5781
5	0.419	99.2890
6	0.416	97.1569
Solución testigo	0.422	

## Discusión de los resultados

Los mejores porcentos de recobro de Idoxuridina se obtuvieron con 5 porciones de 40 ml de solución 0.2 N de ácido clorhídrico (resultados de la tabla 11); para ésta serie de resultados experimentales, la media y la desviación estándar son :  $\bar{X} = 98.9337$  y  $s = 1.0883$  respectivamente. El tratamiento estadístico para éstos resultados corresponde a un contraste de hipótesis para verificar que con el volumen utilizado, la técnica de extracción es cuantitativa.

Los cálculos siguientes corresponden a los resultados de la tabla 11 y las fórmulas utilizadas se describen en el Anexo I.

a).- Hipótesis contrastada:

$$H_0 : \mu = \mu_0$$

donde:

$$\mu_0 = 100$$

$$\sqrt{n} = 2.4494$$

$$\bar{X} = 98.9337$$

$$\alpha = 0.05$$

$$s = 1.0883$$

b).- Estadístico de prueba:

$$t = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

c).- Región crítica bilateral a nivel de significancia  $\alpha$ :

$$t_{\text{calculada}} < t_{\frac{\alpha}{2}}, (n-1) \quad \text{y} \quad t_{\text{calculada}} > t_{1-\frac{\alpha}{2}}, (n-1)$$

$$t_{\text{calculada}} = 2.3999$$

$$t_{0.975} = 2.5706$$

Siendo  $t_{\text{calculada}} < t_{0.975}$ , se acepta la  $H_0 : \mu = \mu_0$ , lo que indica que el volumen utilizado permite que la extracción sea cuantitativa.

d).- Intervalo de confianza :

$$\bar{x} \pm t_{0.975} \cdot (s / \sqrt{n})$$

Límite inferior al 95 % : 97.7917

Límite superior al 95 % : 100.0758

Por tanto se requiere de 5 porciones de 40 ml de solución 0.2 N de ácido clorhídrico para extraer la Idoxuridina de la base de petrolato sólido.

Experimento No. 6

Especificidad del método de análisis .

Objetivo: Analizar el placebo de las formulaciones por el método de extracción con disolvente, para verificar que los resultados inferidos se deben solo al principio activo.

Procedimiento.

Se pesan las siguientes cantidades de placebos:

Formulación 'D' (placebo)

0.3 mg de metilparabeno

0.1 mg de propilparabeno

1 g de base de petrolato  
sólido

Formulación #4 (placebo )

0.3 mg de metilparabeno

0.1 mg de propilparabeno

1 g de base de polietileno-  
aceite mineral

Se disuelve el placebo 'D' con éter etílico y el placebo # 4 con éter de petróleo utilizando el volumen y el procedi-

miento establecido en los experimentos anteriores. Se extrae el placebo 'D' con 5 porciones de 40 ml y el placebo # 4 con 3 porciones de 15 ml de solución 0.2 N de ácido clorhídrico. Los extractos se recolectan en matraces volumétricos de 250 ml; se filtran las soluciones antes de medir su absorbancia a 289 nm .

## Resultados

Determinación de la absorbancia de extractos acuosos de los placebos.

---

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>
Placebo 'D'	0.000
Placebo # 4	0.000

Al no detectar ninguna lectura, se infiere que el resultado de absorbancia se debe al principio activo, por lo que el método de análisis es específico para valorar Idoxuridina en el ungüento como producto. Sin embargo no se puede establecer que el método sea específico para Idoxuridina con respecto a sus productos de degradación.

## Experimento No. 7

### Exactitud y precisión del método de análisis

**Objetivo:** Determinar el % de recobro de Idoxuridina de los dos ungüentos para verificar la concordancia de los resultados obtenidos experimentalmente con el valor real (exactitud) y la concordancia entre resultados sucesivos (repetibilidad).

#### Procedimiento

Se pesan para cada ungüento las siguientes cantidades: 5 mg de Idoxuridina, 0.3 mg de metilparabeno, 0.1 mg de propilparabeno y 1 g de base.

La técnica de valoración de Idoxuridina para el ungüento de polietileno-aceite mineral se describe como:

Se pesa 1 g de ungüento, se disuelve con 30 ml de éter de petróleo y se transfiere a un embudo de separación. Se extrae la Idoxuridina de la fase orgánica con 3 porciones de 15 ml de solución 0.2 N de ácido clorhídrico. Los extractos acuosos se colectan en un matraz volumétrico de 250 ml, aforando al volumen con la misma solución. Antes de medir la absorbancia, las soluciones problema se filtran a través de papel filtro Wattman No. 40.

La técnica de valoración de Idoxuridina para el ungüento de petrolato sólido se describe como :

Se pesa 1 g de unguento y se disuelve con 35 de éter etílico y se transfiere a un embudo de separación. Se extrae la Idoxuridina de la fase orgánica con 5 porciones de 40 ml de solución 0.2 N de ácido clorhídrico agitando en sentido vertical durante 1 minuto. Los extractos acuosos se transfieren a un matraz volumétrico de 250 ml . Antes de medir su absorbancia a 289 nm, las soluciones problema se filtran a través de papel filtro Wattman No. 40 .

Todas las soluciones que contengan Idoxuridina se protegen de la luz.

Solución testigo. Se pesan 25 mg de Idoxuridina y se disuelven en 50 ml de solución 0.2 N de ácido clorhídrico. Una alícuota de 10 ml de ésta solución se aforan a 250 ml diluyendo con solución 0.2 N de ácido clorhídrico . Esta solución equivale a 20 µcg/ml.

Resultados

Tabla 12. Absorbancias y % de Idoxuridina recuperada por extracción a partir del ungüento de polietileno-aceite mineral.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
1	0.410	100.7371
2	0.410	100.7371
3	0.395	97.0516
4	0.402	98.7715
5	0.408	100.2457
6	0.399	98.034
7	0.417	102.4570
8	0.397	97.5430
9	0.414	101.7199
10	0.416	102.2113
Solución testigo	0.407	

Resultados

Tabla 13. Absorbancias y % de Idoxuridina recuperada por extracción a partir del unguento de petrolato sólido.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
1	0.395	99.4962
2	0.4	100.7556
3	0.388	97.7329
4	0.398	100.2518
5	0.396	99.7481
6	0.387	97.4811
7	0.395	99.4962
8	0.404	101.7632
9	0.402	101.2594
10	0.399	100.5037
Solución testigo	0.397	

## Discusión de los resultados

La exactitud y repetibilidad del método de análisis se evalúa aplicando los criterios estadísticos basados en la determinación de contrastes de hipótesis y de intervalos de confianza. Las definiciones y fórmulas de éstos términos se describen en el Anexo I .

### Evaluación de la exactitud del método de análisis.

1.-Cálculo del estadístico de prueba "t" y del intervalo de confianza considerando los resultados experimentales del un - gmento de base de polietileno- aceite mineral ( tabla 12 ).

$$\begin{array}{ll} \bar{X} = 100.09414 & \sqrt{n} = 3.1622 \\ n = 10 & t_{0.975} = 2.2622 \\ s = 2.0419 & \alpha = 0.05 \end{array}$$

a).- Hipótesis contrastada :  $H_0: \mu = \mu_0$ ;  $H_1: \mu \neq \mu_0$   
donde  $\mu_0 = 100 \%$

b).- Estadístico de prueba :

$$t_{\text{calculada}} = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

$$t_{\text{calculada}} = 0.07610$$

c).- Región crítica bilateral al nivel de significancia  $\alpha$  :

$$t_{\text{calculada}} < t_{\frac{\alpha}{2}}, (n-1) \quad \text{y} \quad t_{\text{calculada}} > t_{1-\frac{\alpha}{2}}, (n-1)$$

Al ser  $t_{\text{calculada}} < t_{0.975}$ , se comprueba que el método de análisis para velorar Idoxuridina en el ungüento de polietileno-aceite mineral es exacto.

d).- Intervalo de confianza del 95 % para :

$$\bar{X} \pm t_{0.975} \cdot s / \sqrt{n}$$

Límite inferior al 95 % = 98.5844

Límite superior al 95 % = 101.50964

2.- Cálculo del estadístico de prueba "t" y del intervalo de confianza considerando los resultados experimentales del ungüento de base de petrolato sólido (tabla 13).

$$\bar{X} = 99.8488$$

$$\sqrt{n} = 3.1622$$

$$n = 10$$

$$t_{0.975} = 2.2622$$

$$s = 1.5904$$

$$= 0.05$$

a).- Hipótesis contrastada :  $H_0 \mu = \mu_0$ ;  $H_1 \mu \neq \mu_0$

donde  $\mu_0 = 100 \%$

b).- Estadístico de prueba :

$$t_{\text{calculada}} = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

$$t_{\text{calculada}} = -0.3457$$

Al ser  $t_{\text{calculada}} < t_{0.975}$ , se comprueba que el método de

análisis para valorar Idoxuridina en el unguento de petrolato sólido, es exacto.

c).- Intervalo de confianza al 95 % para :

$$\bar{X} \pm t_{0.975} \cdot s / \sqrt{n}$$

$$\text{Límite inferior al 95 \%} = 98.85384$$

$$\text{Límite superior al 95 \%} = 100.84376$$

Evaluación de la repetibilidad del método de análisis.

1.- Cálculo del estadístico de prueba  $\chi^2$  y del intervalo de confianza considerando los resultados experimentales del unguento de base de polietileno-aceite mineral (table 12).

$$n = 10$$

$$\alpha = 0.05$$

$$s^2 = 4.1693$$

$$\chi^2_{0.95} = 16.919$$

a).- Hipótesis contrastada :

$$H_0 : \sigma^2 \geq \sigma_0^2 \text{ (no repetible)}$$

$$H_1 : \sigma^2 < \sigma_0^2 \text{ (si es repetible)}$$

$$\text{donde } \sigma_0^2 = (3)^2$$

b).- Estadístico de prueba :  $\chi^2$  calculada =  $\frac{(n-1) \cdot s^2}{\sigma_0^2}$

$$\chi^2 \text{ calculada} = 4.1693$$

c).- Región crítica a nivel unilateral superior :

$$\chi^2 \leq \chi^2_{1-\alpha}$$

Al ser  $\chi^2$  calculada  $< \chi^2_{1-\alpha}$ , se acepta la hipótesis alternativa, comprobando que el método de análisis para valorar Idoxuridina en el ungüento de base de polietileno-aceite mineral es repetible.

d).- Intervalo de confianza al 95 % para  $\sigma$ :

Límite inferior al 95 % = 1.1404

Límite superior al 95 % = 3.7279

2.- Cálculo del estadístico de prueba  $\chi^2$  y del intervalo de confianza considerando los resultados experimentales del ungüento de base de petrolato sólido (tabla 13).

$n = 10$	$\chi^2_{0.025, n-1} = 2.700$
$s^2 = 1.93432$	
$\alpha = 0.05$	$\chi^2_{0.975, n-1} = 19.023$

a).- Hipótesis contrastada :  $H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2$   
 $H_1: \sigma^2 > \sigma_0^2$

donde  $\sigma_0^2 = (3)^2$

b).- Estadístico de prueba :  $\chi^2_{calculada} = \frac{(n-1) s^2}{\sigma_0^2}$

$$\chi_{calculada} = 1.93432$$

c).- Región crítica bilateral al nivel de significancia

$\alpha$  :

$$\chi^2_{\text{calculada}} \leq \chi^2_{\frac{\alpha}{2}, (n-1)} \quad \text{y} \quad \chi^2_{\text{calculada}} \geq \chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}, (n-1)}$$

Al ser  $\chi^2_{\text{calculada}} < \chi^2_{\frac{\alpha}{2}}$ , se acepta que el método

de análisis para valorar Idoxuridina del ungüento de petróleo sólido es repetible.

d).- Intervalo de confianza al 95 % para  $\sigma$ :

Límite inferior al 95 % = 0.95661

Límite superior al 95 % = 2.5392

Linealidad del método de análisis

Objetivo: Cuantificar Idoxuridina utilizando diferentes concentraciones para verificar la relación entre la cantidad recuperada y la can tidad de Idoxuridina teórica.

Procedimiento

Se pesan por triplicado para cada unguento las siguientes cantidades de Idoxuridina: 3, 4, 5, 6 y 7 mg, lo que representa el 60, 80, 100, 120 y 140 % de Idoxuridina. Se adiciona para cada muestra 1 g de unguento de polietileno aceite-mine - ral y para otras muestras 1 g de unguento de petrolato sólido. Se utiliza para cada problema metilparabeno al 0.03 % y propilparabeno al 0.01 % .

Se cuantifica la Idoxuridina de las dos bases de acuerdo a los métodos descritos en el experimento No. 7.

Se preparan soluciones testigo que equivalen a 12, 16, 20, 24, y 28  $\mu\text{cg/ml}$ , las que corresponden al 60, 80, 100, 120 y 140 % respectivamente.

## Resultados

Tabla 14. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el ungüento de polietileno-aceite mineral.

mg de Idoxuridina adicionada	Absorbancia (289 nm)	% de Idoxuridina recuperada
3	0.207	50.2834
3	0.220	53.4413
3	0.231	56.1133
Solución testigo	0.247	60
4	0.262	66.1198
4	0.296	74.7003
4	0.304	76.7192
Solución testigo	0.317	80
*5	0.402	99.0147
5	0.400	98.5221
5	0.380	93.5961
Solución testigo	0.406	100
6	0.475	116.5644
6	0.451	110.6748
6	0.445	109.2025
Solución testigo	0.489	120
7	0.500	137.2549
7	0.514	141.0980
7	0.516	141.6471
Solución testigo	0.57	140

\* 5 mg equivalen al 100 % de Idoxuridina recuperada

Tabla 15. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el unguento de petrolato sólido.

mg de Idoxuridina adicionada	Absorbancia (289 nm)	% de Idoxuridina recuperada
3	0.231	57.5610
3	0.247	60.2439
3	0.263	64.1463
Solución testigo	0.247	60
4	0.310	75.3749
4	0.328	79.7568
4	0.311	75.6231
Solución testigo	0.329	80
* 5	0.400	101.5228
5	0.400	101.5228
5	0.359	91.1168
Solución testigo	0.394	100
6	0.476	119.7484
6	0.452	113.7107
6	0.486	122.2642
Solución testigo	0.477	120
7	0.534	134.7027
7	0.541	136.4685
7	0.552	139.2432
Solución testigo	0.555	140

\* 5 mg equivalen al 100 % de Idoxuridina recuperada

## Discusión de los resultados.

Aplicando los criterios estadísticos basados en la determinación de la regresión y correlación de los resultados experimentales, se puede verificar si existe una relación lineal entre la cantidad de Idoxuridina adicionada y la cantidad de Idoxuridina recuperada, con lo que se conoce la respuesta del método de análisis.

Los conceptos y fórmulas de regresión y correlación se describen en el Anexo I.

1.- Cálculo para la linealidad, considerando los resultados obtenidos del ungüento de polietileno-aceite mineral (tabla-14); siendo X la variable independiente representada por los mg de Idoxuridina adicionada y Y la variable dependiente representada por los mg de Idoxuridina recuperada.

$$\Sigma X = 1500$$

$$\Sigma Y = 1424.9519$$

$$\Sigma X^2 = 162\ 000$$

$$\Sigma Y^2 = 149\ 214.4495$$

$$\bar{X} = 100$$

$$\bar{Y}^2 = 94.9967$$

$$s_x = 29.277$$

$$s_y = 31.4513$$

$$\Sigma XY = 155\ 279.718$$

$$n = 15$$

$$\text{grados de libertad } (n-2)_{gl} = 13$$

- a).- Ordenada al origen :  $A = -11.54094$   
 b).- Pendiente :  $B = 1.06537$   
 c).- Error típico de estimación modificado :  
 $s_{y/x} = 3.910504$   
 $\hat{s}_{y/x} = 4.1997$   
 d).- Sensitividad :  $\xi = 0.2536$

2.- Inferencia acerca de la ordenada al origen A, para los resultados obtenidos del ungüento de polietileno-aceite mineral (tabla 14).

- a).- Hipótesis contrastada:  $H_0: A = A_0$   
 $H_1: A \neq A_0$

donde  $A_0 = 0$

- b).- Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$   
 c).- Estadístico de prueba :

$$t_A = \frac{a - A_0}{\hat{s}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum(X_i^2)}{n \sum(X_i - \bar{X})^2}}}$$

$$t_A = -2.89695$$

- d).- Región crítica bilateral a nivel de significancia  $\alpha$  :

$$t_A \leq t_{\frac{\alpha}{2}, (n-2)} \quad \text{y} \quad t_A \geq t_{1 - \frac{\alpha}{2}, (n-2)}$$

Al ser  $t_A (-2.89695) > t_{\frac{\alpha}{2}} (-2.1604)$ , no se acepta la

hipótesis contrastada :  $H_0 : A = A_0$

e).- Intervalo de confianza del 95 % para A :

Límite inferior al 95 % = -2.9343

Límite superior al 95 % = -20.1475

5.- Inferencia acerca de la pendiente B, para los resultados obtenidos de la base de polietileno-aceite mineral (tabla 14).

a).- Hipótesis contrastada :  $H_0 : B = B_0$

$H_1 : B \neq B_0$

donde  $B_0 = 1$

b).- Nivel de significancia = 0.05

c).- Estadístico de prueba :

$$t_B = \frac{(b - B_0) s_x \sqrt{n-1}}{\hat{s}_{y/x}}$$

$$t_B = 1.7050$$

d).- Región crítica bilateral al nivel de significancia :

$$t_B \leq t_{\frac{\alpha}{2}, (n-2)} \quad \text{y} \quad t_B \geq t_{1-\frac{\alpha}{2}, (n-2)}$$

$$t_{\frac{\alpha}{2}} = -2.1604$$

$$t_{1-\frac{\alpha}{2}} = 2.1604$$

Al ser  $t_B (1.7050) < t_{1-\frac{\alpha}{2}} (2.1604)$ , se acepta  $H_0 : B = B_0$

lo que indica que existe regresión.

c).- Intervalo de confianza del 95 % para B :

Límite inferior al 95 % = 0.2577

Límite superior al 95 % = 1.8937

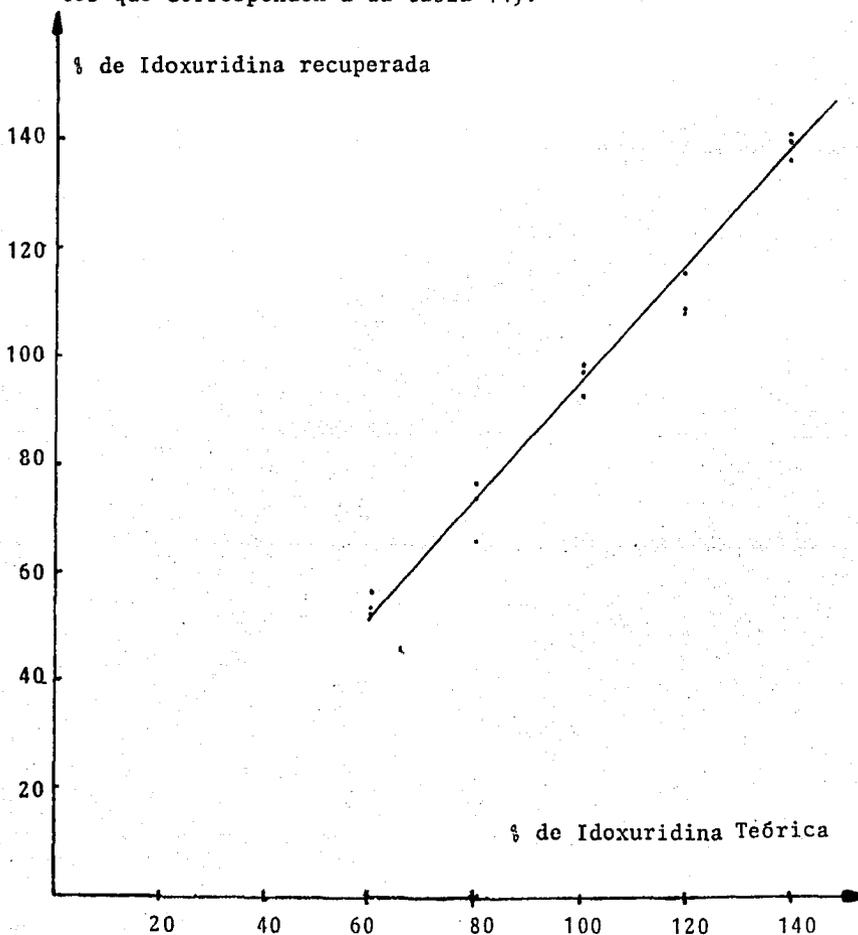
Ecuación de la recta ajustada  $Y = -11.54094 + 1.06557 (X)$

4.- Coeficiente de correlación y coeficiente de determinación :

Coeficiente de correlación  $r = 0.99172$

Coeficiente de determinación  $r^2 = 0.983508$

Gráfica # 4. Linearidad del método de análisis para el ungüento de polietileno-aceite mineral. % de Idoxuridina recuperada vs % de Idoxuridina teórica (dispersión de datos que corresponden a la tabla 14).



n = 15

r = 0.99172

r<sup>2</sup> = 0.983508

Intervalo de confianza para la pendiente

Límite inferior del 95 % = 0.2377

Límite superior del 95 % = 1.8973

Ecuación de la recta ajustada  $\hat{Y} = -11.54094 + 1.06537 (X)$

5.- Cálculo para la linealidad, considerando los resultados obtenidos del unguento de petrolato sólido (tabla 15); siendo X la variable independiente representada por los mg de Idoxuridina adicionada y Y la variable dependiente representada por los mg de Idoxuridina recuperada (% de recobro).

$$\begin{array}{rcl}
 \Sigma X & = & 1500 \\
 \Sigma X^2 & = & 162\ 000 \\
 \bar{X} & = & 100 \\
 s_x & = & 29.2770 \\
 \Sigma Y & = & 1473.0111 \\
 \Sigma Y^2 & = & 156\ 110.9776 \\
 \bar{Y} & = & 98.2007 \\
 s_y & = & 28.6109 \\
 \Sigma XY & = & 158\ 938.904 \\
 n & = & 15
 \end{array}$$

grados de libertad (n-2)

$$gl = 13$$

- a).- Ordenada al origen : A = 1.21909  
 b).- Pendiente : B = 0.9698  
 c).- Error típico de estimación modificado :

$$s_{y/x} = 3.4282$$

$$\hat{s}_{y/x} = 3.6822$$

- d).- Sensitividad  $\xi = 0.26337$

6.- Inferencia acerca de la ordenada al origen A, para los resultados obtenidos del unguento de petrolato sólido (tabla 15)



b).- Estadístico de prueba :

$$t_B = \frac{(b - B_0) s_x \sqrt{n-1}}{\hat{s}_{y/x}}$$

$$t_B = 0.8984$$

c).- Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

d).- Región crítica bilateral al nivel de significancia :

$$t_B \leq t_{\frac{\alpha}{2}}, (n-2) \quad \text{y} \quad t_B \geq t_{1-\frac{\alpha}{2}}, (n-2)$$

$$t_{\frac{\alpha}{2}} = -2.1604 ; \quad t_{1-\frac{\alpha}{2}} = 2.1604$$

Al ser  $t_B (0.8984) < t_{1-\frac{\alpha}{2}} (2.1604)$  ; se acepta  $H_0: B=B_0$ ,

lo que indica que existe regresión.

e).- Intervalo de confianza del 95 % para B;

Límite inferior al 95 % = 0.89719

Límite superior al 95 % = 1.0421

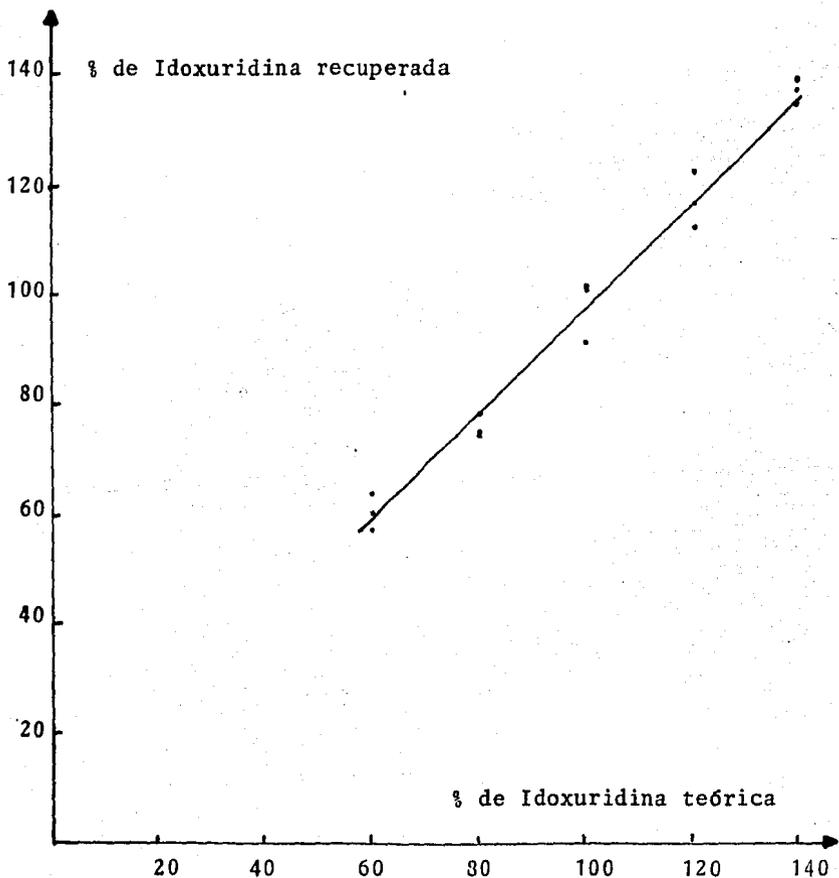
Ecuación de la recta ajustada:  $Y = 1.21909 + 0.9698 (X)$

8.- Coeficiente de correlación y coeficiente de determinación:

Coeficiente de correlación  $r = 0.9923$

Coeficiente de determinación  $r^2 = 0.9846$

Gráfica # 5. Linearidad del método analítico para el Ungüento de petrolato sólido. % de Idoxuridina recuperada vs % de Idoxuridina teórica (dispersión de datos que corresponden a la tabla 15).



$n = 15$

$r = 0.9923$

$r^2 = 0.98465$

Intervalo de confianza para la pendiente

Límite inferior del 95 % = 0.897119

Límite superior del 95 % = 1.04241

Ecuación de la recta ajustada  $\hat{Y} = 1.21909 + 0.9698 (X)$

### 8.3. Evaluación del proceso de mezclado

#### Experimento No. 9

Determinación del tiempo de mezclado.

Objetivo: Cuantificar Idoxuridina a partir de una serie de muestras tomadas a diferentes tiempos de mezclado para determinar el tiempo en el que la desviación estándar de la serie de muestras se aproxime a cero.

#### Procedimiento

Ungüento de base de Polietileno-aceite mineral. Se pesan las siguientes cantidades : polietileno al 6 %, aceite mineral al 94 %, Idoxuridina al 0.5 %, propilparabeno al 0.01 %, metilparabeno al 0.03 %.

La base para el unguento se prepara siguiendo el método descrito en el experimento No. 1. Se adiciona la Idoxuridina, metilparabeno, propilparabeno, se mezcla todo a la velocidad de 21 R.P.M.

Se toman muestras a los 10, 20, 30, 40 y 50 minutos, introduciendo tubos de vidrio en 5 partes del recipiente que contiene el unguento. Se cuantifica Idoxuridina de acuerdo al método establecido en el experimento No 7 ; tomando 1 g de unguento de cada parte inferior y superior del tubo con unguento.

Base de petrolato sólido. Se pesan las siguientes cantidades: petrolato sólido 86.46 %, aceite mineral 8 %, cera de a beja 5 %, Idoxuridina 0.5 %, metilparabeno 0.03 %, propilparabeno 0.01 %. La base para el ungüento se prepara siguiendo el método establecido en el experimento No 1. Se mezcla la Idoxuridina, metilparabeno y propilparabeno con la base a 20 R.P.M.

Se procede a tomar muestras a los 15, 30, 45 y 60 minutos, utilizando un tubo de vidrio y muestreando de la misma manera que para la base de polietileno-aceite mineral. Se cuantifica Idoxuridina siguiendo el método de análisis establecido en el experimento No. 7 .

#### Observaciones:

Para cada tiempo de mezclado se determina la desviación estándar y el coeficiente de variación, donde:

\* s = desviación estándar

\*\*c.v.= coeficiente de variación

Resultados

Tabla No 16. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el ungüento de polietileno-aceite mineral al tiempo de mezclado de 10 minutos a 21 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
1	0.502	115.9353
2	0.485	112.0092
3	0.423	97.6905
4	0.466	107.6212
5	0.475	109.6998
6	0.468	108.0831
7	0.424	97.9215
8	0.488	112.7021
9	-	-
10	0.405	93.5335
Solución testigo	0.433	
* s = 7.82591	** c.v. = 7.373669	

Tabla No 17. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el ungüento de polietileno-aceite mineral al tiempo de mezclado de 20 minutos a 21 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
11	0.46	106.2356
12	0.457	105.5427
13	0.467	107.8522
14	0.477	110.1617
15	0.477	110.1617
16	0.449	103.6952
17	0.466	107.6212
18	-	-
19	0.452	104.3880
20	0.442	102.0785
Solución testigo	0.433	
*s = 2.58495	**c.v. = 2.44679	

Tabla No 18. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el unguento de polietileno-aceite mineral al tiempo de mezclado de 30 minutos a 21 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
21	0.434	101.4019
22	0.433	101.1682
23	0.444	103.7383
24	0.449	104.9065
25	0.448	104.6729
26	0.434	101.4019
27	0.432	100.9346
28	0.44	102.8037
29	0.434	101.4019
30	0.446	104.2056
Solución testigo	0.428	
*s = 1.58541	**c.v. = 1.54428	

Tabla No 19. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el unguento de polietileno-aceite mineral al tiempo de mezclado de 40 minutos a 21 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
31	0.417	97.4299
32	0.434	101.4019
33	0.407	95.0935
34	0.430	100.4673
35	0.415	96.9626
36	0.412	96.2617
37	0.410	95.7944
38	0.430	100.4673
39	0.452	105.6075
40	0.424	99.0654
Solución testigo	0.428	
*s = 3.21765	**c.v. = 3.25492	

Tabla No. 20 . Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el unguento de polietileno-aceite mineral al tiempo de mezclado de 50 minutos a 21 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
41	0.414	96.7290
42	0.440	102.8037
43	0.425	99.2991
44	0.420	98.1308
45	0.467	109.1121
46	0.446	104.2056
47	0.414	96.7290
48	-	-
49	0.436	101.8692
50	0.474	110.7477
Solución testigo	0.428	

\* s = 5.12556

\*\* c.v. = 5.01617

Gráfica # 6. Coeficiente de variación en función del tiempo de mezclado para el unguento de polie tileno-aceite mineral.

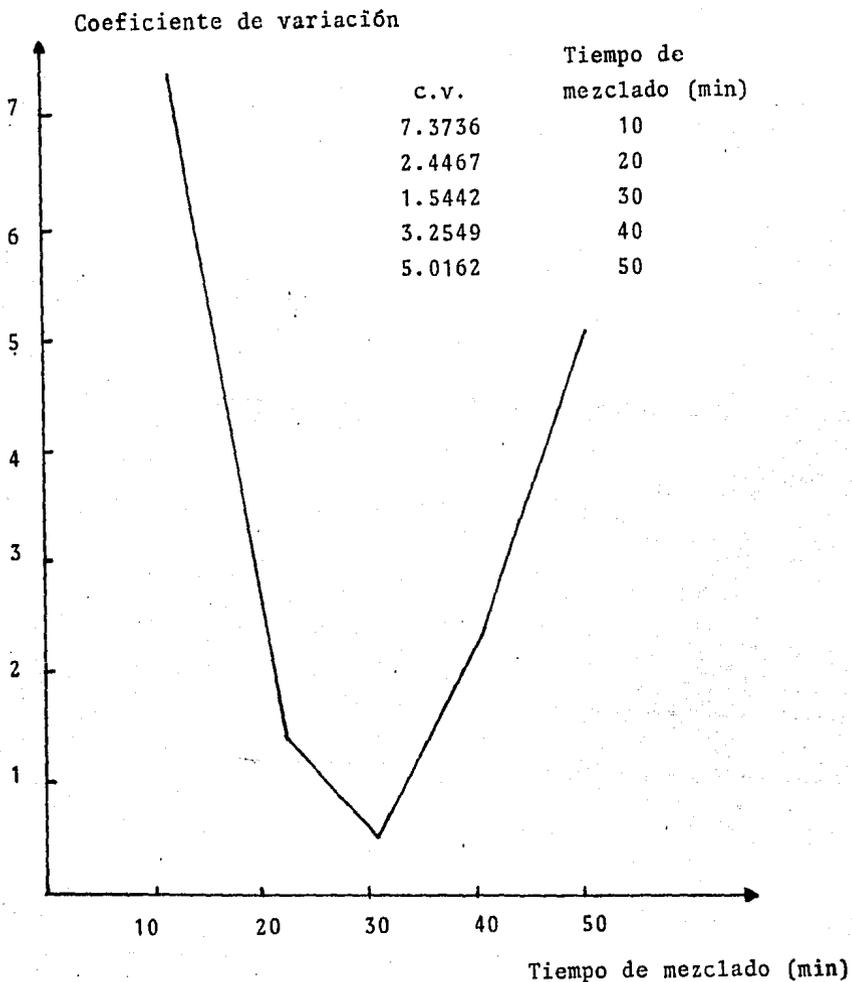


Tabla No 21 . Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el unguento de petrolato sólido al tiempo de mezclado de 15 minutos y 20 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289 nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
51	0.48	112.1495
52	0.443	103.5047
53	0.427	99.7664
54	0.459	107.2430
55	0.429	100.2336
56	0.480	112.1495
57	0.420	98.1308
58	0.450	105.1402
59	0.433	101.1682
60	0.448	104.6729
Solución testigo	0.428	
* s = 4.92375	** c.v. = 4.71552	

Tabla No 22. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el unguento de petrolato sólido al tiempo de mezclado de 30 minutos y 20 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
61	0.44	102.3087
62	0.438	102.3364
63	0.437	102.1028
64	0.418	97.6636
65	0.44	102.8037
66	0.442	103.2710
67	0.419	97.8972
68	0.42	98.1308
69	0.413	96.4953
70	0.422	98.5981
Solución testigo	0.428	
*s = 2.65582	** c.v. = 2.65028	

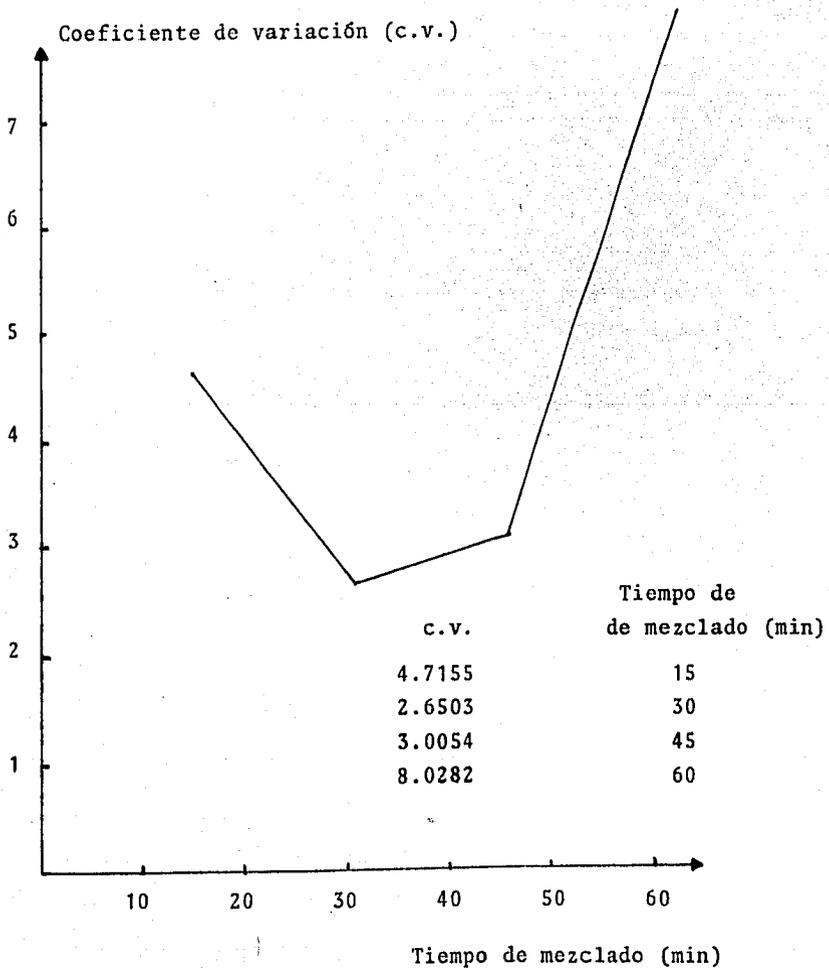
Tabla No 23. Absorbancia y % de Idoxuridina recuperada para el ungüento de petrolato sólido al tiempo de mezclado de 45 minutos y 20 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
71	0.425	99.5316
72	0.435	101.8735
73	0.428	100.2342
74	0.426	99.7658
75	0.431	100.9367
76	0.447	104.6838
77	-	-
78	0.440	103.0445
79	0.403	94.3794
80	0.417	97.6581
Solución testigo	0.427	
*s = 3.0105      ** c.v. = 3.00548		

Tabla No 24 . Absorbancias y % de Idoxuridina recuperada para el ungüento de petrolato sólido al tiempo de mezclado de 60 minutos y 20 R.P.M.

<u>Problema</u>	<u>Absorbancia (289nm)</u>	<u>% de Idoxuridina recuperada</u>
81	0.400	93.6768
82	0.434	101.6393
83	0.344	80.5621
84	0.460	107.7283
85	0.398	93.2084
86	0.407	95.3162
87	0.453	106.0889
88	0.444	103.9813
89	0.432	101.1710
90	0.432	101.1710
Solución testigo	0.427	
*s = 8.15426      ** c.v. = 8.02822		

Gráfica # 7. Coeficiente de variación en función del tiempo de mezclado para el ungüento de petróleo sólido.



## Discusión de los resultados.

Un mejor tratamiento de los resultados se describe en el Anexo II; evaluando de ésta manera el tiempo de mezclado necesario para cada unguento, siendo de 31 minutos para el unguento de polietileno-aceite mineral y de 35 minutos para el unguento de petrolato sólido.

#### 8.4. Manufactura de ungüentos oftálmicos de Idoxuridina

Experimento N.º. 10

Preparación de los lotes piloto en condicio  
nes asépticas.

**Objetivo:** Preparar los ungüentos en un área provista de una campana de aire de flujo laminar y apartir de materias primas y equipo esteri  
lizado, para verificar que las condiciones de trabajo propuestas cumplen con la prueba biológica de esterilidad.

##### Procedimiento

Esterilización de las materias primas. Se pesa el princi  
pio activo y la mezcla de conservadores necesarias para preparar 1 Kg de ungüento, se acondiciona cada una en papel estotra y bolsas de plástico para ser esterilizadas por óxido de etileno.

El polietileno junto con el aceite mineral; el petrolato sólido junto con la cera de abeja, y el aceite mineral, se esterilizan a 140 °C durante 3 horas por calor seco.

Esterilización del material y equipo. Se esteriliza por calor húmedo a 15 lb de presión y durante 15 minutos, el ma  
terial como : gorro, guantes, cubreboca, mangas, bata.

El material que resiste altas temperaturas, se esteriliza por calor seco a 160 °C durante un período de 2 horas como lo especifica la literatura oficial.

El equipo que no puede ser esterilizado por ninguno de los métodos anteriores, se limpian y se sanitizan con solución de fenol al 5 % (como el exterior del mezclador planetario, el agitador caframo, parilla de calentamiento, etc.,). El interior del mezclador planetario se flamea utilizando alcohol, para evitar utilizar la solución de fenol.

Area de trabajo. Se limpia el techo, paredes y piso con agua y jabón, posteriormente se sanitiza con la solución de fenol al 5 %. De igual manera se procede a sanitizar la campana de aire de flujo laminar.

Antes de preparar los lotes piloto, el equipo y material de trabajo se exponen a la luz ultravioleta por el lapso de 24 horas.

Controles ambientales. Se han de colocar placas con agar nutritivo en diversos sitios del área de trabajo, las que permiten verificar el grado de contaminación.

Preparación de los ungüentos. Se procede como en los métodos descritos en el experimento No. 1, utilizando un tiempo de mezclado de 32 minutos para el ungüento de polietileno - aceite mineral y 35 minutos para el ungüento de petrolato sólido.

La preparación de los ungüentos se lleva a cabo dentro de

la campana de aire de flujo laminar, tomando muestras en diferentes puntos de la mezcla con jeringas estériles. Se efectúa la prueba de esterilidad para los lotes de ungüentos, siguiendo el método establecido en la USP XIX p 592.

Resultados

Tabla No 25. Resultados de las pruebas de esterilidad efectuadas a los lotes de ungüentos piloto.

<u>Ungüento</u>	<u>Prueba de esterilidad</u> (USP XIX p 592)
Polietileno-aceite mineral	Pasa la prueba
Petrolato sólido	Pasa la prueba

Esquema de lugares de exposición de las placas con agar nutritivo dentro del área de trabajo.

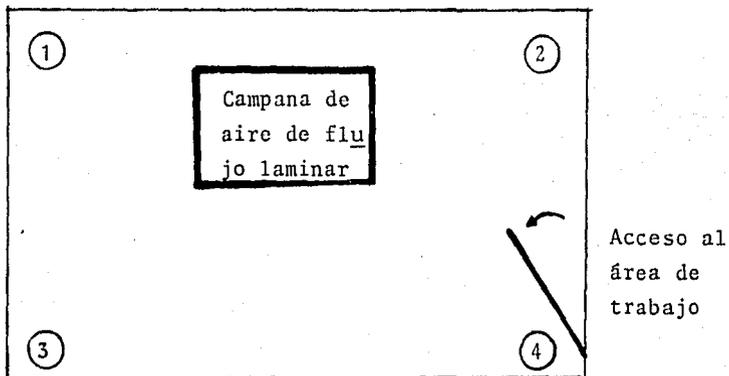


Tabla No 26 . Número de colonias detectadas en las placas con agar nutritivo expuestas en el área de trabajo durante la preparación del unguento de polietileno-aceite mineral

<u>Lugar de exposición</u>	<u>Cuenta total de colonias</u> <u>Tiempo de incubación: 48 hrs.</u>
1	2
2	1
3	8
4	1
Parte superior de la campana de aire de flujo laminar	2
Testigo dentro de la campana de aire de flujo laminar	

Tabla No 27. Número de colonias detectadas en las placas con agar nutritivo expuestas en el área de trabajo durante la preparación del unguento de petrolato sólido.

<u>Lugar de exposición</u>	<u>Cuenta total de colonias</u> <u>Tiempo de incubación : 48 hrs</u>
1	1
2	3
3	6
4	1
Parte superior de la campana de aire de flujo laminar	4
Testigo dentro de la campana de aire de flujo laminar	0

Ensayo de la efectividad del conservador.

Objetivo: Inocular con microorganismos cada uno de los lotes de ungüentos oftálmicos, para evaluar la efectividad conservadora del metil y propilparabeno de las formulaciones.

#### Procedimiento

Descripción de la técnica de ensayo de la efectividad del conservador (18) :

Preparación del inóculo. Se recupera con agua destilada y esterilizada, la superficie de microorganismos de la cepa joven (incubada de 18 a 24 Hrs a 35-37 °C en medio de agar soya-tripticaseína).

La suspensión de bacterias se ajusta a una densidad óptica de 0.32 a la longitud de onda de 525 nm , con solución salina. Se elimina la solución de bacterias a la cual se le determina la absorbancia.

Determinación de la cuenta bacteriana. Se efectúan diluciones de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ , de la suspensión de bacterias ajustadas en forma secuencial, sembrando por triplicado 0.05 ml de cada dilución en medio de agar soya-tripticaseína. Se incuban a 37 °C de 18 a 24 horas.

Solución prueba. 10 g de problema se diluyen con agua a

100 ml en un matraz volumétrico.

Inoculación de la solución prueba. Una alícuota de 0.05 ml de la suspensión de bacterias ajustada diluida 1:10, se inocula a 10 ml de la formulación prueba.

Contacto y tiempo de contacto. A intervalos específicos - de 0.17, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 48 y 72 horas, se transfiere una alícuota de 1 ml de la formulación prueba inoculada y 1 ml del control positivo a volúmenes iguales de 40 ml de caldo de tioglicolato que contenga un inactivador químico efectivo.

Se incuban los tubos inoculados con bacterias por un mínimo de 3 días a 35-37 °C. Después del tiempo de incubación, - verificar visualmente los tubos para determinar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano.

Una alícuota de 0.05 ml, origina aproximadamente de  $10^5$  a  $10^6$  células.

Controles :

Control negativo. Contiene solución salina estéril

Control positivo. Contiene 0.01 % de cloruro de benzalcohol en agua destilada estéril.

Observaciones:

Microorganismos prueba: Candida albicans, Staphilacoccus aureus, Pseudomona aeruginosa.

Los microorganismos prueba se ajustaron a las siguientes densidades ópticas:

Microorganismo Prueba	Densidad óptica (525 nm)
<u>Candida albicans</u>	0.323
<u>Staph. aureus</u>	0.316
<u>Ps. aeruginosa</u>	0.318

Efectuando diluciones y por la determinación en placa, se calculó el número de bacterias: una alícuota de 0.5 ml de la cepa de Candida albicans ajustada a la densidad óptica con + tiene  $258.5 \times 10^6$  bacterias, 0.5 ml de la cepa de Staph. aureus ajustada contiene  $9.4 \times 10^6$  bacterias; 0.1 ml de la cepa de Ps. aeruginosa ajustada contiene  $153.5 \times 10^6$  bacterias.

Preparación de la solución problema. 10 g de ungüento se disuelven en 50 ml de agua hirviendo. Se mantiene el calentamiento hasta que el ungüento se funde, se deja enfriar y se filtra la mezcla. Se recupera lo filtrado en un matraz volumétrico de 100 ml; se efectúan lavados con porciones de 20 ml de agua hirviendo. Una vez fría la solución se afora con agua destilada estéril. 10 ml de ésta solución son inoculados con los microorganismos prueba. Se utiliza Tween 80 como inactivador químico.

Tabla No. 28. Resultado de la actividad conservadora del metil y propilparabeno en el unguento de polietileno-aceite mineral (tiempo de contacto de 0.5 a 72 horas).

<u>Microorganismo inoculado</u>	<u>Resultado</u>	<u>Resultado del control positivo</u>
<u>Candida albicans</u>	Presencia de crecimiento bacteriano	Ausencia de crecimiento bacteriano
<u>Ps. aeruginosa</u>	Presencia de crecimiento bacteriano	Ausencia de crecimiento bacteriano
<u>Staph. aureus</u>	Presencia de crecimiento bacteriano	Ausencia de crecimiento bacteriano

Tabla No. 29. Resultado de la actividad conservadora del metil y propilparabeno en el unguento de petrolato sólido. (Tiempo de contacto de 0.5 a 72 horas).

<u>Microorganismo inoculado</u>	<u>Resultado</u>	<u>Resultado del control positivo</u>
<u>Candida albicans</u>	Presencia de crecimiento bacteriano	Ausencia de crecimiento bacteriano
<u>Ps. aeruginosa</u>	Presencia de crecimiento bacteriano	Ausencia de crecimiento bacteriano
<u>Staph. aureus</u>	Presencia de crecimiento bacteriano	Ausencia de crecimiento bacteriano

## 9. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos después de determinar las características organolépticas, la apariencia, la consistencia y la estabilidad física de seis formulaciones propuestas, se seleccionaron la formulación No 2 que contiene: polietileno al 6 %, aceite mineral al 94 %, Idoxuridina al 0.5 %, metilparabeno al 0.03 %, propilparabeno al 0.01 % y la formulación "B" que contiene : petrolato sólido al 86.46%, cera de abeja al 5 %, aceite mineral al 8 %, Idoxuridina al 0.5 %, metilparabeno al 0.03 %, propilparabeno al 0.01 %.

Para las dos formulaciones se establecieron mediante experimentos y analizando los resultados matematicamente por el método de polinomios ortogonales los tiempos de mezclado de 31 minutos para el ungüento de base de polietileno-aceite mineral y de 35 minutos para el ungüento de base de petrolato sólido, lo que permite obtener uniformidad en el contenido del principio activo.

En relación al conservador, se observó que las concentraciones de metilparabeno (0.03 %) y de propilparabeno (0.01%) utilizadas en las formulaciones carecen de actividad conservadora.

La inferencia estadística indica que el método para la valoración de Idoxuridina en el ungüento de petrolato sólido es específica en relación a los demás componentes de la formula-

ción, es exacto, repetible y lineal; además ofrece la ventaja de ser un método rápido y no requiere de más equipo que el utilizado comunmente en el laboratorio.

Para el unguento de base de polietileno-aceite mineral, - el método es específico en relación a los demás componentes, - es axacto, repetible. En cuanto a la linearidad del método , la inferencia estadística indica que la ordenada al origen de la recta que se obtiene de la relación entre la Idoxuridina teórica y la Idoxuridina recuperada no es cero, lo que indica la presencia de un error del tipo proporcional.

Por lo tanto, de las dos formulaciones de unguentos, se selecciona la que contiene petrolato sólido, ya que las materias primas son accesibles, su preparación involucra la utilización de equipo sencillo como el mezclador planetario y no existe problema para cuantificar Idoxuridina.

## 10. PROPUESTAS

El método para determinar la consistencia, solo permitió observar el efecto de adicionar cera de abeja y aceite mineral al petrolato sólido y de adicionar polietileno al aceite mineral. Sin embargo, un estudio más detallado sería determinar la viscosidad a diferentes "velocidades de corte", lo que da como resultado las llamadas curvas de "consistencia"; las cuales describen el comportamiento de éstos semisólidos al adicionar excipientes ó bien describen cambios que se originan por la acción mecánica durante su manufactura. Por lo tanto, se propone efectuar dichos estudios al unguento que contiene petrolato sólido.

En relación al método de análisis propuesto y con el objeto de confiar aún más en los resultados obtenidos, se propone validar el método para el unguento de petrolato sólido; determinando la especificidad en relación a los productos de degradación, la sensibilidad y la reproducibilidad. Por otra parte, se propone aumentar la concentración de metil y propilparabeno en el unguento de petrolato sólido y efectuar nuevamente la prueba de efectividad del conservador.

El criterio para confiar en el método de análisis propuesto se basa en aplicar la inferencia estadística, lo que implica determinar la Exactitud, Precisión y Linearidad del método analítico. Se describen las definiciones y fórmulas utilizadas para estos conceptos (35, 36).

A.- Exactitud. La exactitud se define como la concordancia de los resultados experimentales y el valor real. La inferencia estadística para evaluar la exactitud consiste en aplicar un contraste de hipótesis y un intervalo de confianza.

1.- Contraste de hipótesis. Permite comprobar que los resultados obtenidos en la práctica pertenecen a una distribución teórica donde el parámetro  $\mu_0 = 100 \%$ , es el valor real.

a).- Hipótesis contrastada:  $H_0: \mu = \mu_0$  para determinar que el método es exacto contra una hipótesis alternativa  $H_1: \mu \neq \mu_0$ , para determinar que el método no es exacto con un criterio de probabilidad del 95 %.

b).- Estadístico de prueba  $t$  :

$$t = \frac{\bar{X} - \mu_0}{s / \sqrt{n}}$$

donde:

$\bar{X}$  = al promedio en porcentaje de recobro de  $n$  muestras independientes

$\mu$  = parámetro cuyo valor real es 100 %

$s/\sqrt{n}$  = error estándar, donde s es la desviación estándar muestral y n el número de muestras.

2.- Intervalo de confianza. Establece los límites en los que se encuentra el verdadero valor y se calcula mediante:

$$\text{Intervalo de confianza} = \bar{X} \pm t_{0.975} \cdot s/\sqrt{n}$$

B.- Precisión. Se refiere a la desviación ó la dispersión de resultados con respecto a un valor central. La precisión puede evaluarse mediante la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de los resultados experimentales.

La repetibilidad es la concordancia de una serie de resultados sucesivos obtenidos a partir de un mismo método y bajo las mismas condiciones de trabajo.

1.- La inferencia estadística para evaluar la repetibilidad involucra el cálculo del estadístico de prueba  $\chi^2$  (Ji-cuadrada). Donde  $\sigma^2$  es la varianza poblacional y representa la variabilidad del método, la cual no es mayor del 3 %.

a).- Hipótesis contrastada :  $H_0: \sigma^2 = \sigma_0^2$ , para comprobar que el método es repetitivo contra una hipótesis alternativa  $H_1: \sigma^2 > \sigma_0^2$ , donde  $\sigma_0 = 3\%$ , a un nivel de significancia de 0.05.

b).- Estadístico de prueba  $\chi^2$  :

$$\chi^2 = \frac{(n - 1) (s^2)}{\sigma_0^2}$$

donde:

n = número de muestras

$s^2$  = varianza muestral

$\sigma^2$  = parámetro que representa el 3 % de la variabilidad

2.- Intervalo de confianza. Representa los límites en los que se encuentra el verdadero valor de  $\sigma^2$ , se calcula como:

$$\sqrt{\frac{(n-1) s^2}{\chi_1^2 \frac{\alpha}{2}}} < \sigma < \sqrt{\frac{(n-1) s^2}{\chi^2 \frac{\alpha}{2}}}$$

C.- Linearidad. El tratamiento estadístico que se le da a los resultados experimentales es aplicar al análisis de regresión y correlación.

1.- El análisis de la regresión establece la relación entre la cantidad adicionada de Idoxuridina (X) y el % de Idoxuridina recuperada (Y) al establecer una relación lineal con la ecuación de la recta  $Y = A + B (X)$ ; donde "A" representa la ordenada al origen y "B" representa la pendiente de la recta.

Para determinar la pendiente y la ordenada al origen se utiliza el método de mínimos cuadrados y las notaciones son:

$$a = \frac{(\sum Y) (\sum X^2) - (\sum X) (\sum XY)}{n (\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$B = \frac{n (\sum XY) - (\sum X) (\sum Y)}{n (\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

2.- Se aplica la inferencia estadística para la ordenada al origen y la pendiente mediante el cálculo de estadísticos de prueba y de intervalos de confianza.

Inferencia acerca de la ordenada al origen "A":

a).- Hipótesis contrastada: Ho: A = A<sub>0</sub>

H<sub>1</sub>: A ≠ A<sub>0</sub>

donde A<sub>0</sub> = 0, valor del parámetro (ordenada al origen que indica el valor de la respuesta medida que corresponde a cero de concentración). Con n-2 grados de libertad y estimando "A" a un 95 % de confianza.

b).- Estadístico de prueba "t" :

$$t = \frac{a - A_0}{\hat{s}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}}$$

donde:

$\hat{s}_{y/x}$  = es el error típico de estimación modificado calculado como:  $\hat{s}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} \cdot s_{y/x}$

$$y : s_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - A (\sum Y) - B (\sum XY)}{n}}$$

c).- Intervalo de confianza para la ordenada "A" :

$$a - t_{\frac{\alpha}{2}} \hat{s}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}} < A < a + t_{1 - \frac{\alpha}{2}} s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

Inferencia acerca de la pendiente "B" :

a).- Hipótesis contrastada:  $H_0: B = B_0$

$H_1: B \neq B_0$

donde  $B_0 = 1$ , lo que representa la variación de las 'Y' con respecto a las 'X'; con n-2 grados de libertad y una confianza del 95 %.

b).- Estadístico de prueba 't'

$$t_B = \frac{(b - B_0) s_x \sqrt{n-1}}{\hat{s}_{y/x}}$$

c).- Intervalo de confianza para la pendiente "B"

$$b - t_{\frac{\alpha}{2}} \frac{\hat{s}_{y/x}}{s_x \sqrt{n-1}} < B < b + t_{1 - \frac{\alpha}{2}} \frac{\hat{s}_{y/x}}{s_x \sqrt{n-1}}$$

3.- El análisis de correlación se caracteriza por la dependencia entre dos variables. Se determina por el número llamado como coeficiente de correlación lineal entre "X" y "Y".

$$r = \frac{n (\Sigma XY) - (\Sigma X) (\Sigma Y)}{\sqrt{[n (\Sigma X^2) - (\Sigma X)^2] [n (\Sigma Y^2) - (\Sigma Y)^2]}}$$

Determinación del tiempo de mezclado.

El método de análisis matemático para determinar el tiempo de mezclado se basa en la técnica de polinomios ortogonales (37).

El método se puede dividir en 4 pasos

- a).- Selección del modelo
- b).- Estimación de los parámetros
- c).- Evaluación predictiva del modelo
- d).- Determinación del tiempo de mezclado

el cual se desarrolla en función a los resultados provenientes de la gráfica # 6.

Determinación del tiempo de mezclado para el ungüento de base de polietileno-aceite mineral.

- a).- Selección del modelo.

Al revisar la gráfica # 6, se propone que el método empírico que relaciona el coeficiente de variación (Y) con el tiempo de mezclado (X); en base al comportamiento gráfico y al propósito del experimento es:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 t_i + \beta_2 t_i^2 + E_i \dots \dots \dots (1)$$

donde :

$Y_i$  = i-ésimo coeficiente de variación asociado al -

- i-ésimo tiempo de mezclado

$\left. \begin{array}{l} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \end{array} \right\}$  parámetros del modelo

$t_i$  = i-ésimo tiempo de mezclado

$E_i$  = error experimental

b).- Estimación de los parámetros del modelo.

El método de mínimos cuadrados, mediante una transformación de unidades en el tiempo de mezclado; permite estimar de una manera sencilla a los parámetros del modelo (1).

Una presentación matricial del modelo (1) en base a los datos de la gráfica # 6 es :

$$\begin{array}{c|c|c|c|c}
 7.3736 & 1 & 10 & 100 & \beta_0 \\
 2.4467 & 1 & 10 & 400 & \beta_1 \\
 1.5442 & 1 & 10 & 900 & \beta_2 \\
 3.2549 & 1 & 10 & 1600 & \\
 5.0162 & 1 & 10 & 2500 & 
 \end{array} = \begin{array}{c} E_1 \\ E_2 \\ E_3 \\ E_4 \end{array}$$

al efectuar la siguiente transformación:

$$z_i = \frac{t_i - \bar{t}}{d} \dots\dots\dots(2)$$

$$z_i^2 = \left[ \frac{t_i - \bar{t}}{d} \right]^2 - \frac{n^2 - 1}{12} \dots\dots\dots(3)$$

donde:

$n$  = número de tiempos de muestreo

$d$  = intervalo entre los tiempos de muestreo

El modelo (1) en función de (2) y (3) se reescribe como:

$$Y_i = \beta'_0 + \beta'_1 z_i + \beta'_2 z_i^2 + E_1 \dots \dots \dots (4)$$

la representación matricial en función de (2) y (3) es:

$$\begin{bmatrix} 7.3736 \\ 2.4467 \\ 1.5442 \\ 3.2549 \\ 5.0162 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & -2 & 2 \\ 1 & -1 & -1 \\ 1 & 0 & -2 \\ 1 & 1 & -1 \\ 1 & 2 & 2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta'_0 \\ \beta'_1 \\ \beta'_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} E_1 \\ E_2 \\ E_3 \\ E_4 \end{bmatrix} \dots \dots \dots (5)$$

que es equivalente a:

$$\underline{Y} = \underline{Z} \underline{\beta}' + \underline{E} \dots \dots \dots (6)$$

El estimador del vector  $\underline{\beta}'$  por el método de mínimos cuadrados es:

$$\hat{\underline{\beta}}' = (\underline{Z}' \underline{Z})^{-1} \underline{z}' Y \dots \dots \dots (7)$$

Apartir de (5)

$$\underline{Z}' \underline{z} = \begin{bmatrix} 5 & 0 & 0 \\ 0 & 10 & 0 \\ 0 & 0 & 14 \end{bmatrix} \dots \dots \dots (8)$$

$$(z' z)^{-1} = \begin{bmatrix} 1/5 & 0 & 0 \\ 0 & 1/10 & 0 \\ 0 & 0 & 1/14 \end{bmatrix} \dots\dots\dots (9)$$

$$z' Y = \begin{bmatrix} 19.6356 \\ -3.9066 \\ 15.9896 \end{bmatrix} \dots\dots\dots (10)$$

Al sustituir (8), (9) y (10) en (7) y al reducir :

$$\hat{\beta}' = \begin{bmatrix} 3.927120 \\ -0.39066 \\ 1.142114 \end{bmatrix} \dots\dots\dots (11)$$

apartir de los resultados anteriores; en función de (4) :

$$\hat{Y}_i = 3.92712 - 0.39066 z_i + 1.42114 z_i^2 \dots\dots\dots (12)$$

al sustituir (3) y (2) y al reducir :

$$\hat{Y}_i = 3.97712 - 0.39066 \left[ \frac{t_i - 30}{10} \right] + 1.42114 \left[ \left( \frac{t_i - 30}{10} \right)^2 - \frac{5^2 - 1}{12} \right] \dots\dots\dots (13)$$

$$\hat{Y}_i = 15.04708 - 0.89175 t_i + 0.0142114 t_i^2 \dots\dots\dots (14)$$

c).- Evaluación predictiva del modelo.

En la siguiente tabla se comparan los valores de coeficiente de variación experimentales con el coeficiente de variación en función de la ecuación (14) :

t	$Y_i$	$\hat{Y}_i$
10	7.3736	7.5507
20	2.4467	2.8966
30	1.5442	1.0848
40	3.2549	2.1153
50	5.0162	5.9881

Subjetivamente se puede indicar que el modelo predice adecuadamente los valores experimentales del coeficiente de variación. Una medida objetiva que determina en eficiencia el modelo para predecir el valor experimental es el coeficiente de correlación. Este se calcula mediante:

$$r^2 = 1 - \frac{\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{\sum (Y_i - \bar{Y})^2} \dots\dots\dots (15)$$

apartir de la tabla

$$\sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 = 1.598052 \dots\dots\dots (16)$$

$$\sum (Y_i - \bar{Y})^2 = 21.38615 \dots\dots\dots (17)$$

al sustituir (17) y (16) en (15) y al reducir :

$$r^2 = 0.9253 \dots\dots\dots (18)$$

Indicando éste valor que el modelo se puede utilizar para predecir el coeficiente de variación dentro de la región experimental debido a que  $r^2$  es cercano a la unidad.

d).- Determinación del tiempo de mezclado.

En función de la ecuación (14) la determinación del tiempo de mezclado se propone como:

$$\frac{dY}{dt} = 0 \dots\dots\dots(19)$$

Ya que se desea predecir a que tiempo de mezclado se obtiene un coeficiente de variación mínimo.

Al sustituir (14) en (19) :

$$\frac{dY}{dt} = -0.89175 + 0.0284228 t \dots\dots\dots(20)$$

Al reducir:

$$t = 31.37 \text{ minutos} \approx 31 \text{ minutos}$$

Se sugiere que el tiempo de mezclado para el unguento de la base de polietileno-aceite mineral sea de aproximadamente 30 minutos.

Utilizando un procedimiento semejante con los datos provenientes del unguento de base de petrolato sólido se obtuvo un tiempo de mezclado aproximado de 35 minutos.

### 13. BIBLIOGRAFIA

1. SIMPSON, CH.: ZAPPALA, A.; (1964)  
J. Am. Pharm. Sci., 53, [10], 1201
2. CONNORS, K.; "Chemical Stability of Pharmaceutical",  
John Wiley & Sons, (1979), 243
3. CHARLES, S.; RAVIN, L.; (1964)  
J. Pharm. Sci., 53, 976
4. CHARLES, S.; RAVIN, L.; (1964)  
J. Pharm. Sci., 53, 1064
5. MARTINDALE, " The Extra Pharmacopei" , Pharmaceuti -  
cal Press, London, 26 Edition (1978), 912
6. Remington's Pharmaceutical Sciences, Marck Publishing  
Co., 16 th Edition, (1980), 1498
7. KRAMER, G.; (1978)  
Survay of Ophtalmology, 22, [5], 335
8. ENGLER, G.; (1981)  
Pharmacy Int., 2, [6], 141
9. LANWORTH, A.; (1975)  
Bull Parent. Drug Ass., 29, [5], 238
10. RESENBERG, S.; (1970)  
Bull Parent. Drug Ass., 24, [2], 94

11. O'NEIL, J.; POLLI, G.; (1973)  
Bull Parent. Drug Ass., 27, 201
12. LACHMAN, L.; " Theory and Practice of Industrial  
Pharmacy", Lea & Feberger Philadelphia, 2nd. Ed.,  
(1976), 509
13. JONES, E.; LEWICHI, B.; (1951)  
J. Apha. Sci., 40, 509
14. NEWTON, W.; (1973)  
J. Pharm. Sci., 62, [9], 1538
15. JURGENS, W.; (1974)  
J. Pharm. Sci., 63, [3], 443
16. "Farmacia Práctica de Remington", Ed. Hispanoameri  
cana, (1965), 525
17. BROWN, M.; (1965)  
J. Soc. Cosmetic Chem., 16, 369
18. Comunicación directa con la Q.F.B. Domitila Burgos
19. McCABE, W.; SMITH, J.; "Operaciones básicas de In-  
geniería Química" , Editorial Reverté S.A., (1969),  
90
20. "The United States Pharmacopeia" XX Rev.,  
United States Pharmacopeial Convention, Rockeville,  
Md., (1980)
21. CARR, G.; (1978)  
Journal of Chromatography, 157, 171

22. MATTSON, L.; WENDELL, H.; (1948)  
Anal. Chem. , 21, [11], 1389
23. STUPF, P.; (1947)  
J. Biol. Chem., 169, 367
24. MUTIMER, M.; RIFFKIN, CH.; (1956)  
J Am. Pharm. Ass., 45, 102
25. COLOMBO, M.; "Control of Physical Properties in  
Pharmaceutical Forms", Ed. Medico Farmaceutica  
Milano, Italy, (1976), 41
26. MUTINER, M.; RIFFKIN, CH.; (1956)  
J. Pharm. Ass., 45, 212
27. KOSTIN, B.; MARTIN, A.; (1854)  
A. Am. Pharm. Ass., Ed. Sci., 43, 401
28. MARTIN, A.; "Physycal Pharmacy", Lea & Feberger  
Philadelphia", 2nd Ed., (1969), 591
29. GULISECH, J.; RAVIN, J.; (1964)  
J. Am. Pharm. Ass., NS4, [3], 122
30. BANKER, G.; "Nedren Pharmaceuticals", J.B. Luspenco  
cotl Co., (1982), 545
31. HUGBO, P.; (1976)  
Can. J. Pharm. Sciences, 11, [2], 66
32. COMMITE OF OFFICIAL; (1980)  
Pharm. Acta Helvetiae, 55, [2], 40

33. COOPER and GUNN' S, "Tutorial Pharmacy",  
Ritman Med., Sixt Edition, (1979), 200
34. PARROT, E., "Pharmaceutical Technology", Burger  
Publishing Co., (1971), 369
35. RICHARD, R.; SCHORH, A.; "Estadística Biométrica  
y Sanitaria", Prentice/Hall Ineternational , (1974),  
47
36. DESIRE, M.; DIJKSTRA, A.; KAUFMAN, L.;  
"Evaluation and Optimization of Laboratory Methods",  
Elsevier Scientic Publishing Company: (1978), 7
37. YOUNGER, M.; "A Handbook for Linear Regrsion:",  
Buxbury Press; (1979), 511