

13  
2<sup>o</sup> y.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
"ZARAGOZA"

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO  
MEDIANTE LA PRUEBA DE EFECTIVIDAD  
PRESERVATIVA DE TRES DIFERENTES CON-  
SERVADORES USADOS EN PRODUCTOS IN-  
YECTABLES A DIFERENTE CONCENTRACION**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

ELIO CORTES CAMACHO



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN 1989**



## **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

	Pág.
1.- INTRODUCCION	1
2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA	3
3.- GENERALIDADES	5
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
5.- OBJETIVOS	22
6.- HIPOTESIS	23
7.- MATERIAL Y EQUIPO	24
8.- METODOLOGIA	28
9.- RESULTADOS	45
10.-DISCUSION DE RESULTADOS	55
11.-CONCLUSIONES	59
12.-BIBLIOGRAFIA	61

## 1.- INTRODUCCION

La concentración de los agentes que forman un sistema conservador antimicrobiano dentro de un medicamento, pueden disminuir a lo largo de su vida de anaquel, debido a diferentes factores, en un grado tal que no proteja al producto.

Dentro de las formulaciones líquidas de tipo estéril es muy importante el papel que desempeña un sistema conservador, tanto para la estabilidad del medicamento como para la seguridad del paciente; por tanto, es necesario establecer la concentración a la que siguen siendo efectivos tales agentes antimicrobianos.

Para conocer tal concentración, es conveniente efectuar "La prueba de efectividad de conservadores".

En el presente trabajo se expone un estudio de correlación entre la prueba de efectividad conservadora (APE test), y la concentración de conservadores. Dicho estudio se llevó a cabo para tres diferentes formulaciones de inyectables:

Dos suspensiones de corticosteroides con un sistema conservador formado por alcohol bencílico, metilparabeno y propilparabeno, y una solución de antibiótico con un sistema conservador de metilparabeno y propilparabeno.

De este modo se obtuvo la información para conocer las -  
concentraciones mínimas a las cuales el medicamento seguía man-  
teniéndose protegido contra la contaminación microbiana.

## 2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA.

La administración de fármacos a un paciente por inyección debajo o a través de una o más capas de la piel o membranas mucosas, ha sido designada como ruta parenteral (1). Los productos farmacéuticos así administrados se conocen como parenterales, estas formas farmacéuticas dosificadas que poseen una pureza excepcionalmente alta, deben estar libres de compuesto tóxicos y de contaminación microbiana, por lo cual se deben seleccionar cuidadosamente todos los componentes y procesos involucrados en su fabricación para eliminar las contaminaciones de origen físico, químico y microbiológico (2), (3).

Los cambios causados por oxígeno pueden ser minimizados reemplazándolos con un gas inerte tal como el nitrógeno, mediante el llenado al vacío o por el uso de un agente antioxidante (4). Los cambios causados por el crecimiento de hongos y/o bacterias pueden ser prevenidas por esterilización del producto o por el empleo de un agente antimicrobiano, que es menos efectivo. Los cambios debidos a reacciones químicas y contaminación microbiana también son retardados por el almacenaje a bajas temperaturas.

La prevención de la contaminación microbiana es muy importante en la fabricación de medicamentos y especialmente en aquellos, cuya formulación son expedidas en forma estéril y para las formulaciones líquidas estériles es necesario demostrar la efectividad del sistema conservador que se encuentra presente,

de modo que garantice la esterilidad del producto.

En común con todas las preparaciones farmacéuticas, el -- problema es la estabilidad y su aceptabilidad. Lograr ambos ob jetivos es usualmente requerido por la industria farmacéutica, el médico, el vendedor y el paciente.

Debido a los riesgos y peligros potenciales derivados de la contaminación microbiológica se ha incrementado desde hace - varias décadas el estudio de los agentes conservadores, en tal grado que actualmente se cuenta con un gran número y variedad - de éstos.

### 3.- GENERALIDADES

#### 3.1.- PRODUCTOS ESTERILES.

Son formas farmacéuticas dosificadas libres de contaminación microbiana y de compuestos tóxicos; por lo cual se deben seleccionar cuidadosamente todos los componentes y procesos involucrados en su fabricación para eliminar las contaminaciones de origen físico, químico y microbiológico.

El desarrollo de los productos estériles no fue posible sino hasta después de los trabajos sobre microbiología de Koch y Pasteur, y de que Chamberland desarrollará las técnicas de esterilización por aire caliente y vapor; más o menos al mismo tiempo Nordtmeyer desarrollaba un filtro hecho por Kieselguhr (filtro Berkefeld) y Limousin diseñaba una ampolleta de vidrio.

En los 1800's Wood inventó la jeringa. En 1870, la Real Sociedad Médica y Quirúrgica de Londres, redactó un reporte en que estableció las bases de la terapia hipodérmica y señaló que los fármacos inyectados bajo la piel tendrían los mismos efectos terapéuticos que los que se administraban oralmente, no obstante aquéllos podrían diferir en intensidad. El reporte sugiere que las soluciones para ser inyectadas deben ser claras y neutras.

En 1874, la Farmacopea Británica reconoció oficialmente la primera solución inyectable, una solución de morfina.



En 1889, se preparó una inyección de ergotamina con 1% de fenol como agente conservador. En 1905, Duffour hizo una tesis doctoral sobre la esterilización de soluciones hipodérmicas. En 1911, Martindale y Wynn enfatizaron la importancia de los procesos de esterilización y las técnicas asépticas para la manipulación de los componentes en la fabricación de inyectables.

A mediados del siglo XX, el Dr. Seibert proporcionó pruebas de que la fiebre después de una inyección, era una reacción causada por productos del crecimiento bacteriano que podían ser eliminados del agua por destilación y del vidrio por calentamiento a temperaturas elevadas.

Todo esto permitió el desarrollo de los productos estériles como los encontramos en nuestros días.

Los productos estériles presentan las siguientes características generales.

**ESTERILIDAD:** Consiste en la ausencia total de microorganismos vivos. Es el factor fundamental en la preparación de -- productos de esta naturaleza, ya que la introducción de microorganismos a un tejido u organismo puede causar una enfermedad o incluso la muerte.

**ISOTONICIDAD:** Significa que una solución tiene la misma presión osmótica que la célula o fluidos biológicos con que estará en contacto.

La isotonicidad se logra añadiendo sales a las soluciones inyectables u oftálmicas en las cuales es un requisito. Existen fórmulas y tablas en la literatura para calcular soluciones isotónicas, así como métodos de control.

pH: Es un factor muy importante tanto para el producto - en cuanto a su estabilidad y efectividad, como para el paciente al que se le administra el medicamento para evitarle molestias y daños innecesarios. Para lograr la estabilización del pH se utilizan sistemas amortiguadores que deben ser de baja capacidad para que no ocasionen cambios significativos en la zona donde se aplique el producto.

CONSERVACION: Los productos farmacéuticos estériles deben ser capaces de evitar el crecimiento de microorganismos, por lo que es necesario la adición de agentes conservadores así como - la elección de un envase adecuado, que no interaccione con el - producto y lo aisle perfectamente del medio. Esto es especialmente importante para los productos contenidos en envases multi dosis.

LIBRE DE PIROGENOS: Los pirógenos son productos metabólicos de las bacterias que producen un incremento en la temperatura corporal cuando se introducen a un organismo, por lo que su control es importante en el caso de los inyectables.

### 3.2.- CONSERVADORES

Un conservador es una sustancia que es adicionada a algunas preparaciones para prevenir el crecimiento de los microorganismos y por tanto evitar la descomposición del producto, esto es importante para la seguridad del paciente como para la estabilidad del producto, se usan básicamente en contenedores multiuso, para inhibir el crecimiento de microorganismos y no deben utilizarse únicamente como sustituto de una buena manufactura.

Por su propia naturaleza, los agentes conservadores actúan sobre células vivas y, por tanto, deben ser controladas como tales tanto por separado como con la fórmula a la que se agregan para poder determinar los efectos de toxicidad, irritación y sensibilización (5).

Algunos agentes antimicrobianos pueden exhibir las propiedades protectoras de un conservador; por supuesto, tales sustancias son tóxicas.

El conservador idóneo debe ser:

- Efectivo contra un amplio espectro de microorganismos.
- Estable física, química y microbiológicamente durante la vida de anaquel del producto.
- No tóxico.
- Compatible con los componentes de la formulación.
- No debe sensibilizar.

Clasificación de los conservadores:

Los agentes antimicrobianos se pueden clasificar en cuatro grandes grupos:

- Acídicos
- Neutros
- Mercuriales
- Sales cuaternarias de amonio.

## CONSERVADORES MAS USUALES

TABLA No. I

Clase de Conservador		Concentración usual (%)
Acídicos	Fenol	2 - 5
	Clorocresol	0.5 - 1
	Parabenos	0.05 - 0.1
	Acido Benzoico y Sales	0.01 - 2
	Acido Sórbito y Sales	0.5 - 2
Neutros	Clorobutanol	0.5
	Alcohol Bencílico	1.0
	Alcohol B-feniletílico	0.2 - 1.0
Mercuriales	Timerosal	0.01 - 1
	Acetato Fenilmercúrico	0.01 - 0.05
	Nitromersol	0.01 - 1
Sales Cuaternarias de Amonio	Cloruro de Benzalconio	0.04 - 0.2
	Cloruro de Cetilpiridina	0.1 - 0.2

Concentración de los Conservadores mas usuales.

### PARABENOS

Los alquilésteres del ácido parahidroxibenzoico, más comunmente conocidos como parabenos, constituyen uno de los grupos más importantes de conservadores farmacéuticos.

Los etil, metil, propil, butil y bencil ésteres solos o en combinación, han sido usados para la conservación de prácticamente -- todo tipo de preparaciones sujetas a deterioro microbiano.

Jarabes, infusiones, emulsiones, preparaciones oftálmicas, unguentos, supositorios y soluciones parenterales son varios ejemplos de medicamentos y productos cosméticos en los cuales ha -- sido utilizado el efecto antimicrobiano de varios parabenos.

Por lo regular se usan las combinaciones de dos o más parabenos pues tienen un efecto sinérgico; esto quiere decir que la actividad bacteriostática ha sido mayor que la suma del efecto individual de cada éster (6) y por éstas razones son frecuentemente empleados en varias combinaciones.

El éster metílico es en particular efectivo contra bacterias, aunque menos efectivo contra hongos, pero a medida que se incrementa la longitud de la cadena alquílica, la actividad de los -- ésteres aumenta volviéndose tan eficaces para frenar el desarrollo de bacterias como hongos. Se ha demostrado (7) que la concentración requerida del éster metílico para la destrucción de

bacterias en estado vegetativo en 24 h. es de 0.15 a 0.20%, -- pero el éster propílico es inefectivo. Sin embargo frente a -- hongos, en concentración del 0.012%, es efectivo. Sykes, G. (8) preparó y probó los ésteres n-alquilo hasta C16 y encontró la mayor actividad fungicida con los grupos hexilo y heptilo. Lang y Rye (9) trabajando con ésteres marcados (carboxilo con  $^{14}C$ ) y E. coli mostraron que la actividad antibacteriana aumenta con el tamaño de la molécula. Si se tiene en cuenta que los ésteres -- son compuestos lipofílicos, su sitio de acción probablemente sea la membrana celular, sin descartar un efecto producido sobre -- sistemas enzimáticos por acción competitiva.

#### REACTIVIDAD DE LOS PARABENOS CON MACROMOLECULAS

Los parabenos, en común con otros conservadores como el clorobutanol, se unen en diferentes grados a macromoléculas, coloides, detergentes no iónicos y otros agentes emulsificantes perdiendo actividad, también los materiales de envasamiento causan el mismo efecto, por ejemplo: el polietileno y el polipropileno reducen la actividad del metilparabeno cuando se hallan en medio -- acuoso. Pese a esto, los ésteres del ácido parahidroxibenzoico se comportan mejor que otros conservadores como los mercuriales orgánicos, el clorobutanol, el cloro-ebesol y los compuestos de amonio cuaternario (10) (11).

## TOXICIDAD DE LOS PARABENOS

Los parabenos prácticamente no producen irritación, pero en razón de su uso tan extendido en toda clase de productos, a través de los años, se refieren algunos casos de personas sensibilizadas a estos ésteres aunque no se probó si la reacción fue debida al conservador (12).

Un estudio (13) en Estados Unidos dió como conclusión que los parabenos son bastante seguros para uso general.

## 3.3.- MONOGRAFÍAS

## PROPILPARABENO

Fórmula Química:



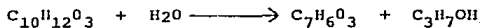
Propilparabeno, p-hidroxibenzoato de propilo, nipasol.

$C_{10}H_{12}O_3=180$ . Polvo cristalino, blanco, inodoro, sin sabor o con un sabor muy ligero. p.f.: 95 - 98° C (6).

Solubilidad: Soluble 1/2500 de agua fría; 1/400 de agua caliente; 1/3.5 de etanol; 1/3 de acetona; 1/4 de cloroformo; 1/3 de éter; 1/140 de glicerol; 1/6 de propilén glicol; 1/140 de aceites fijos; solubles en metanol; fácilmente en soluciones alcalinas.

Estabilidad: Incompatible con álcalis y sales de hierro. Sufre catálisis ácida y básica. El pH de máxima estabilidad está entre 4 y 5.

El propilparabeno se hidroliza produciendo ácido p-hidroxibenzoico y propanol:





Otros datos: Se ha encontrado que el propilparabeno y el metilparabeno se unen a la macromolécula cetomacrogol mediante enlaces no covalentes. Se cree que la especie unida es inefectiva como agente conservador (15).

Métodos de Análisis:

- a) Método oficial (Farmacopea Nacional): Valoración residual - con ácido sulfúrico.
- b) Método especificado en la USP XX: Cromatografía de gases.
- c) Espectroscopía U.V.
- d) Cromatografía en capa fina.
- e) Resonancia magnética nuclear.
- f) Método bromométrico, previa hidrólisis.
- g) CLAR.

Usos: Se utiliza como conservador en concentraciones de 0.05 - 0.25% sólo o en compañía de otros parabenos.

## METILPARABENO

Fórmula Química:

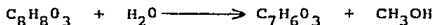


Metilparabeno, p-hidroxibenzoato de metilo, nipagin.  $C_8H_8O_3=152.1$   
 Polvo cristalino, fino, blanco y amargo. Produce la sensación  
 de que quema la boca y la lengua, seguido por entumecimiento. -  
 $pKa=9.46$ ; p.f.  $125 - 128^\circ C$  (6).

Solubilidad: 1/100 de agua; 1/120 de agua hirviendo; 1/3.5 de -  
 etanol; 1/3 de acetona;; 1/140 de cloroformo; 1/10 de éter; 1/3  
 de propilénglicol; 1/140 de aceite vegetal; 1/160 de glicerol -  
 caliente; soluble en benceno y tetracloruro de carbono.

Estabilidad: Se hidroliza catalíticamente en presencia de áci-  
 dos y bases, además es incompatible con las sales de hierro. El  
 pH de máxima estabilidad es 4, por lo cual se utiliza en un in-  
 tervalo de pH de 3 - 9.

El metilparabeno se hidroliza produciendo ácido p-hidroxibenzoí-  
 co y metanol (6):



Otros datos: La velocidad de hidrólisis del metilparabeno se -  
 incrementa ligeramente al aumentar la fuerza iónica.

La actividad antimicrobiana se reduce de un 75 a un 100% en la presencia de silicato de magnesio y aluminio al 1%, talco, poli sorbato 80 y trisilicato de magnesio.

Algunos plásticos como el nylon 6 absorben al metilparabeno y - al propilparabeno disminuyendo su actividad antimicrobiana contra Aspergillus niger, Klesbsiella aerógenes y Pseudomona aeruginosas (15).

Métodos de Análisis:

- a) Método oficial (Farmacope Nacional): Valoración residual con ácido sulfúrico usando como indicador el azul de bromotimol S.I. Se compara con el color de una solución amortiguadora de fosfato pH 6.6 que contiene la misma cantidad de conservador.
- b) Método especificado en la USP XX: Cromatografía de gases.
- c) Espectroscopía U.V.
- d) Cromatografía en capa fina
- e) Resonancia Magnética nuclear.
- f) Método bromométrico, previa hidrólisis
- g) CLAR

Usos: Se utiliza como conservador en concentraciones de 0.05 - 0.25%. Se usa en combinación con otros parabenos como el butil y etilparabeno en medicamentos para el tratamiento de faringitis.

## ALCOHOL BENCILICO

Fórmula Química:



Fenilcarbinol, fenilmetanol.  $C_6H_5OH = 108.1$ . Líquido incoloro con un sabor ligeramente picante. P.e. =  $203 - 208^\circ C$ .  
 $d = 1.043 - 1.046$  g/ml. (6).

Solubilidad: Es soluble 1/25 de agua. Miscible con alcohol, - cloroformo, éter, en aceites fijos y volátiles.

pH: Una solución en agua es neutra al litmus.

Estabilidad: Las soluciones pueden ser esterilizadas en autoclave. Se oxida lentamente a benzaldehído y ácido benzoico a la exposición del aire. Incompatible con agentes oxidantes.

Se requiere protegerlo de la luz (6).

Efectos Tóxicos: La inyección intratecal de alcohol bencilico al 0.9% causó meningitis aséptica en perros.

Métodos de Análisis:

- Método especificado en la USP XX: Cromatografía de gases.
- Espectroscopía de fluorescencia.
- Valoración yodométrica.
- CLAR

Uso: Analgésico y conservador. La concentración usual es 1%.

## BISULFITO DE SODIO

Cristales prismáticos incoloros o blancos. Tiene un olor a azufre y sabor salino ácido. El bisulfito de sodio es una -- mezcla de varias proporciones de bisulfito de sodio ( $\text{NaHSO}_3$ ) y metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), contiene de 58.5% a 67.4 de  $\text{SO}_2$ .

Solubilidad: Soluble 1 en 2 partes de agua; poco soluble en -- etanol, muy soluble en glicerol.

Estabilidad: Inestable en presencia de oxígeno, en medio ácido se libera  $\text{SO}_2$ .

Método de Análisis: Método oficial (Farmacopea Nacional) Valoración residual con tiosulfato de sodio.

Usos: El bisulfito de sodio es un agente reductor fuerte usado como antioxidante en soluciones. Usualmente es puesto en con-- centraciones de 0.1% pero concentraciones de 0.01% a 1.0% han -- sido empleadas.

El bisulfito de sodio es usado como un conservador en solucio-- nes ácidas y jarabes, su acción antimicrobiana es debido a la -- presencia de dióxido de azufre y ácido sulfuroso liberado por -- reacción entre el bisulfito de sodio y el ácido. Su efectivi-- dad es contra muchas bacterias, hongos y levaduras a pHs ácidos en concentraciones de 200 p.p.m. o más.

Toxicidad: Irritación gástrica debida a la liberación de ácido sulfuroso seguida a la ingestión de bisulfito de sodio y otros sulfitos, en grandes dosis hay cólico, disturbios circulatorios y depresión del sistema nervioso central.

#### 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Al realizar un estudio de estabilidad sobre una solución inyectable de sulfato de gentamicina se encontró (16) que la -- disminución en la concentración de los agentes conservadores no afectaba y se mantenía la protección del producto contra la con taminación microbiana.

Surgió entonces la idea de realizar una serie de experimentos controlados con el fin de encontrar cuál era la concentración mínima, en la cual se tenía aún dicha protección tanto en la solución inyectable como en dos suspensiones diferentes -- de corticosteroides que fueron sumadas al estudio y así saber -- también para estas el efecto de la disminución en la concentración de sus conservadores antimicrobianos. Tal evaluación se -- realizó por medio de la prueba de efectividad de actividad conservadora (APE Test) descrita en la USP XX.

## 5.- OBJETIVOS

- 5.1. Establecer la concentración mínima de metilparabeno y propilparabeno, que deba poseer una solución inyectable de sulfato de gentamicina, para preservarla de la contaminación microbiana.
- 5.2. Establecer la concentración a la cual siga siendo efectivo el sistema conservador formado por metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico, en dos suspensiones inyectables de corticosteroides.

En ambos objetivos se establecen tales concentraciones correlacionando los resultados obtenidos en la prueba de efectividad de actividad preservativa, con las cantidades adicionadas de los agentes conservadores incluidos en las diferentes soluciones y suspensiones manufacturadas.



## 6.- HIPOTESIS

Se espera que para la formulación de sulfato de gentamicina, la sola presencia del bisulfito de sodio en concentración de 0.32% (usado como agente antioxidante en la formulación) sea la que - de el efecto antimicrobiano y que al disminuir la concentración de bisulfito de sodio en solución placebo sin parabenos, la ac tividad antimicrobiana disminuya.

Para las suspensiones de corticosteroides se espera que la ac- - ción antimicrobiana sea efectiva en las formulaciones con al- - cohol bencílico como único conservador. Así también la disminu ción en la concentración del sistema conservador, formado por - metilparabeno, propilparabeno y alcohol bencílico afectará, dis minuyendo la protección antimicrobiana en las suspensiones.

## 7.- MATERIAL Y EQUIPO

Materias primas.

Sulfato de gentamicina	Beisa
Acetato de prednisolona	Beisa
Betametasona fosfato de sodio	Beisa
Betametasona dipropionato	Beisa
Metilparabeno	Industrias Químicas del Centro S.A.
Propilparabeno	Industrias Químicas del Centro S.A.
Alcohol bencílico	Merck
Bisulfito de sodio	Baker
Butilparabeno	Inuii Yakuhim Kosyo

Reactivos.

Metanol absoluto	Baker
Fosfato de potasio monobásico	Baker
Alcohol etílico	Baker
Tiosulfato de sodio	Baker
Acido clorhídrico	Baker
Yoduro de potasio	Baker
Yodo	Merck
Tiodene indicador	Fisher Scientific

Medios y diluentes.

Agar digerido de soya-casefina	Bioxon 11 - 7
Medio fluido de soya-casefina	Bioxon 107
Agar dextrosa-sabouraud	Merck 30140
Solución fisiológica salina	(0.9%)
Tween-salino	(0.05%)

Material biológico.

<u>Pseudomona aeruginosa</u>	ATCC 9027
<u>Escherichia coli</u>	ATCC 8739
<u>Staphylococcus aureus</u>	ATCC 10231
<u>Aspergillus niger</u>	ATCC 16404

Equipo.

Agitador magnético	Termolyne
Bomba peristáltica	Materflex Cole-Parmer
Medidor de oxígeno	Beckman
Potenciómetro	Beckman (C III)
Termómetro	- 10 200°C Propper
Llenadora de ampollitas	Cozzoli H - S1
Centrífuga	Beckman Tj - 6
Espectrofotómetro	Beckman AC - III
Cromatógrafo de líquidos	Hewlet-Packard 1084 A
Mezclador	Vortex

Molino	Silverson L 2 R
Estufa de incubación	Forma Scientific
Autoclave	AMSCO
Balanza Analítica	Mettler H 35AR
Balanza granataria	Mettler P 160 N
Equipo de filtración	Millipore
Matraces Erlenmeyer	100, 500, 1000 ml Pyrex
Matraces de yodo	250 ml Pirex
Vasos de precipitado	50, 100, 500 ml Pirex
Matraces Kitasato	1000 ml Pirex
Pipetas graduadas	1, 5, 10 ml 1/1000 Pyrex
Pipetas volumétricas	1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 25, 50 ml Pyrex
Matraces aforados	50, 100, 200, 250, 1000 ml Pyrex
Cajas de Petri	100 x 20 mm Pyrex
Botellas Roux	
Tubos de ensaye	13 x 10 Pyrex
Tubos de centrifuga	50 ml con tapón <u>esmerila</u> do
Crisol	
Gradilla	
Mechero Bunsen	

Material de empaque.

Ampolleta de vidrio

Tipo I de 2 y 3 ml

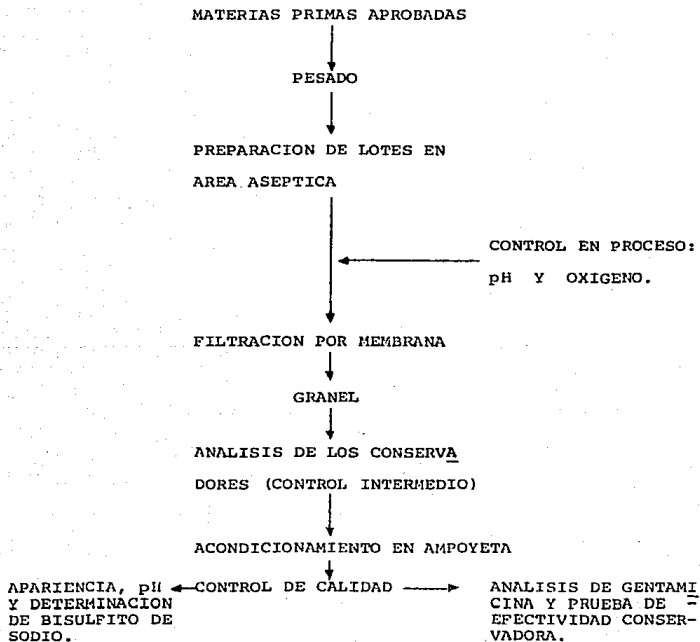
Ampolleta siliconizada de vidrio

Tipo I de 2 ml

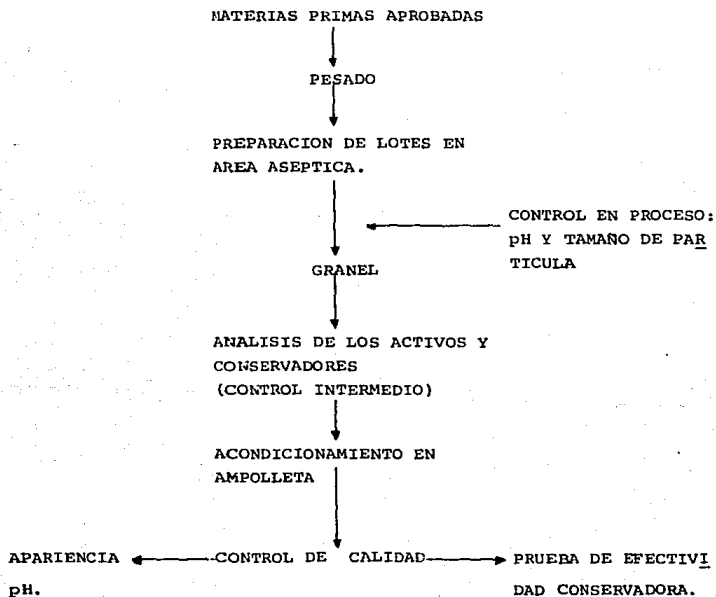
## 8.- METODOLOGIA

8.1.- FABRICACION DE LAS FORMULACIONES

8.1.1.- Preparación de los lotes de solución inyectable de sulfato de gentamicina.



8.1.2.- Preparación de los lotes de las suspensiones inyectables de dipropionato de betametasona-fosfato sódico de betametasona y de acetato de prednisolona.



8.2.- VARIACION EN LAS CONCENTRACIONES DE CONSERVADORES PARA LAS DIFERENTES FORMULACIONES.

8.2.1.-Lotes de solución inyectable de sulfato de gentamicina.

a) Lotes sin bisulfito de sodio

TABLA No. II

Lote	Propilparabeno mg/ml	Metilparabeno %	Metilparabeno mg/ml	%
1 y 2	-----	-----	-----	-----
3 y 4	0.02	10.0	0.52	40.0
5 y 6	0.04	20.0	1.04	80.0
7 y 8	0.20	100.0	1.30	100.0

Proporciones y concentración de parabenos en los lotes sin bisulfito de sodio.



b) Lotes sin parabenos

TABLA No. III

Lote	Bisulfito de sodio mg/ml	%
1 y 2	----	----
3 y 4	0.8	25
5 y 6	1.6	50
7 y 8	2.4	75
9 y 10	3.2	100

Proporción y concentración de bisulfito de sodio en los lotes sin parabenos

c) Lotes placebo de sulfato de gentamicina, sin parabenos.

TABLA No. IV

Lote	Bisulfito de sodio mg/ml	%
1 y 2	----	----
3 y 4	0.8	25
5 y 6	1.6	50
7 y 8	2.4	75
9 y 10	3.2	100

Proporción y concentración de bisulfito de sodio en los lotes placebo de sulfato de gentamicina, sin parabenos.

8.2.2. Lotes de suspensión inyectable de dipropionato de betametasona-fosfato de betametasona.

TABLA No. V

Lote	Alcohol benzílico		Metilparabeno		Propilparabeno	
	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%
1	---	---	---	---	---	---
2 y 3	9.0	100	---	---	---	---
4 y 5	6.75	75	---	---	---	---
6	9.0	100	1.3	100	0.20	100
7 y 8	6.75	75	0.97	75	0.15	75
9 y 10	4.5	50	0.65	50	0.10	50
11 y 12	2.25	25	0.32	25	0.05	25
13 y 14	---	---	1.3	100	0.20	100

Proporción y concentración de conservadores en los Lotes de suspensión inyectable de dipropionato de betametasona-fosfato de betametasona.

TABLA No. VI

Lote	Alcohol bencílico		Metilparabeno		Propilparabeno	
	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%
1	---	---	---	---	---	---
2 y 3	9.0	100	---	---	---	---
4 y 5	6.75	75	---	---	---	---
6	9.0	100	1.8	100	0.2	100
7 y 8	6.75	75	1.35	75	0.15	75
9 y 10	4.5	50	0.9	50	0.1	50
11 y 12	2.25	25	0.45	25	0.05	25
13 y 14	---	---	1.8	100	0.20	100

Proporción y concentración de conservadores en los Lotes de suspensión inyectable de acetato de prednisona.

## 8.3.- ANALISIS QUIMICO DE LAS FORMULACIONES

## 8.3.1.- Análisis de los Lotes de sulfato de gentamicina.

## a) Cuantificación de propilparabeno y metilparabeno.

## METODO ANALITICO

INSTRUMENTO CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS

COLUMNA: 30 CM X 4 mm. (D.I.) ACERO INOXIDABLE EMPACADA CON ~~4~~BONDAPAK C-18 (WATERS ASSOCIATES, MILFORD MASS)

FASE MOVIL: METANOL/AGUA 5:5

DETECTOR: U.V. A 254 NM

FLUJO: 1.2 ML/MIN

ESTANDAR INTERNO: BUTILPARABENO

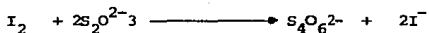
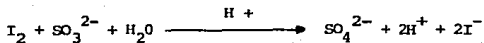
TIEMPO DE RETENCION APROXIMADOS:

METILPARABENO	2.5 MIN.
PROPILPARABENO	4.0 MIN.
BUTILPARABENO	5.5 MIN.

- b) Cuantificación de bisulfito de sodio, como dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>).

METODO ANALITICO

REDOX



REACTIVOS:

1. Solución de yodo 0.1 N

a) En un matraz de 1000 ml. colocar 100 ml. de agua destilada, disolver 36 g. de yoduro de potasio y adicionar tres gotas de ácido clorhídrico. Agitar.

b) Adicionar 14 g. de yodo metálico y disolver.

c) Aforar al volumen con agua. No es necesario estandarizar.

2. Solución de yodo 0.01 N.

Transferir 10 ml. de solución de yodo 0.1 N recién preparada a un matraz volumétrico de 100 ml. y aforar con agua destilada.

3. Solución tiosulfato de sodio 0.1 N.

Disolver 26 g. de tiosulfato de sodio y 200 g. de bicarbonato de sodio en 1000 ml. de agua destilada recién hervida y fría.

Estandarizar la solución conforme a la U.S.P" XXI.

4. Solución tiosulfato de sodio 0.01 N

Transferir 10 ml. de solución de tiosulfato de sodio a un matraz volumétrico de 100 ml., aforar con agua recientemente hervida y fría.

PROCEDIMIENTO:

1. Transferir 20.0 ml. de solución de yodo 0.01 N a un matraz Erlenmeyer de 125 ml.
2. Adicionar 1.0 ml. de HCl concentrado y agitar.
3. Adicionar 2.0 ml. de muestra y agitar. Lavar las paredes -- del matraz con 5 ml. de agua destilada.
4. Titular la solución con tiosulfato de sodio 0.01 N hasta ob tener un color ligeramente amarillento.
5. Adicionar 75 mg. de almidón yodurado y continuar titulando -- hasta que la solución sea incolora.
6. Colocar 20.0 ml. de yodo 0.01 N, 1.0 ml. de HCl concentrado

y 2.0 ml. de agua destilada en otro matraz Erlenmeyer, rotular "Blanco". Titular con tiosulfato de sodio 0.01 N en la misma -- forma descrita en los pasos anteriores.

**CALCULOS:**

$$\text{mg SO}_2/\text{ml.} = (\text{Vb} - \text{Vo}) \times \text{N} \times \frac{64.06}{2} \times \frac{1}{2} *$$

**DONDE:**

N = Normalidad de tiosulfato de sodio

Vo = Volumen del tiosulfato usado para titular la muestra.

Vb = Volumen de tiosulfato usado en el blanco

64.06 = Peso molecular del SO<sub>2</sub>

2\* = Volumen de la muestra

8.3.2.- Análisis de los lotes de la suspensión inyectable de --  
dipropionato de betametasona - Fosfato sódico de beta-  
matasona.

a) Cuantificación de propilparabeno.

METODO ANALITICO

INSTRUMENTO: CRMATOGRFO DE LIQUIDOS

COLUMNA: 30 CM x 4 mm. (D.I.) ACERO INOXIDA--  
BLE, EMPACADA CON  $\mu$ -BONDAPAK C<sub>18</sub>

FASE MOVIL: METANOL/SOLUCION DE SULFATO DE POTASIO 0.045 M 42/58

DETECTOR: U.V. A 254 NM

FLUJO: 1.2 ML/MIN

ESTANDAR INTERNO: BECLOMETASONA DIPROPIONATO

TIEMPOS DE RETENCION:

BETAMETASONA FOSTATO DE SODIO	3.4 MIN.
PROPILPARABENO	4.5 MIN.
BETAMETASONA DIPROPIONATO	11.4 MIN.
BECLOMETASONA DIPROPIONATO	14.0 MIN.



## b) Cuantificación del alcohol bencílico y metilparabeno

## METODO ANALITICO

## PARAMETROS OPERACIONALES

INSTRUMENTO	CROMATOGRAFO DE LIQUIDOS
COLUMNA:	ACERO INOXIDABLE 30 CM. x 4 mm. (D. I.) EMPACADA CON $\mu$ -EONDAK C-18
FASE MOVIL:	SOLUCION DE FOSFATO MONOBASICO DE POTASIO (6.2%), METANOL 25/35
DETECTOR:	U.V. a 254 NM.
FLUJO:	1.0 ML/MIN.
ESTANDAR INTERNO:	BUTILPARABENO
TIEMPOS DE RETENCION:	
ALCOHOL BENCILICO	4 MIN.
METILPARABENO	5 MIN.
FOSFATO SODICO DE BETAMETASONA	6 MIN.
BUTILPARABENO	14 MIN.

8.3.3.- Análisis de los Lotes de suspensión inyectable de acetato de prednisolona.

- a) Cuantificación de alcohol bencílico, metilparabeno y -- propilparabeno.

METODO ANALITICO

PARAMETROS OPERACIONALES:

INSTRUMENTO: CROMATOGRFO DE LIQUIDOS

COLUMNA: 30 CM. x 4 mm. (D.I.) ACERO INOXIDABLE EMPACADA CON FENIL  $\mu$ -BONDAPAK

FASE MOVIL: METANOL/BUFFER ACETATOS 0.01 M 31/69

DETECTOR: U.V. 254 NM.

FLUJO: 2 ML/MIN.

ESTANDAR INTERNO: ETILPARABENO

TIEMPO DE RETENCION:

ALCOHOL BENCILICO	4.0 MIN.
METILPARABENO	8.0 MIN
ETILPARABENO	14.0 MIN.
PROPIPARABENO	27.2 MIN.

#### 8.4.- PRUEBA DE EFECTIVIDAD PRESERVATIVA.

(Conservadores)

La siguiente prueba sirve para demostrar el nivel de efectividad de cualquier compuesto antimicrobiano, agregado a algún producto farmacéutico en especial para aquellos que van a ser -- aplicados por vía oftálmica o parenteral.

#### ORGANISMOS DE PRUEBA

Se deben usar cultivos de pureza certificada de los siguientes microorganismos: Pseudomona aeruginosa, Candida albicans, Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Aspergillus niger.

#### MEDIOS

Para el cultivo inicial del germen de prueba se selecciona el medio de agar que le sea más favorable, Agar de dextrosa para los cultivos de C. albicans y A. Niger y agar digerido de soya-caseína para las bacterias E. Coli, P aeruginosa y S. aureus.

#### PREPARACION DEL INOCULO

Como preparación para la prueba se inculca la superficie de un volumen adecuado del medio sólido de agar, con un desarro-

llo reciente de los cultivos de la copa original, de cada uno de los microorganismos especificados.

Los cultivos bacterianos se incuban a 37°C, entre 18 y - 24 horas; los de C. albicans y A. niger, a 25°C durante 48 horas y una semana, respectivamente.

Para cosechar el cultivo bacteriano, la superficie desarrollada se lava con solución salina (0.9%), estéril, los líquidos del lavado se reciben en un recipiente adecuado y se agrega más solución salina para ajustar la cuenta microbiana a aproximadamente  $10^8$  microorganismos/ml.

#### PROCEDIMIENTO

Se utilizan cinco tubos bacteriológicos estériles de tamaño apropiado. En cada uno se depositan 20 ml. de la preparación por valorar y 0.1 ml. de cada microorganismo en diferente tubo y se agitan para mezclarlos.

Los tubos inoculados, se incuban entre 20 y 25°C. Se examinan las muestras a los 7, 14, 21 y 28 días anotando los cambios aparentes que se observen y determinando el número de microorganismos viables presentes en cada uno de los intervalos de tiempo, por el método de cuenta en placa.

## EVALUACION

El lote pasa la prueba si:

1. En el séptimo día de la prueba la reducción microbiana - obtenida es del 100%. En este caso la prueba puede ser descontinuada.
2. La concentración de bacterias viables es menor de 0.1% de la concentración inicial para el día 14 y la concentración de levaduras y hongos viables es igual o se encuentra por debajo de la concentración inicial durante los primeros 14 días de la prueba.
3. La concentración de bacterias viables es menor de 0.1% y - la concentración de hongos y levaduras viables es igual o se encuentra por debajo de la concentración inicial al cabo de los - 28 días de la prueba.

FIGURA No. 1

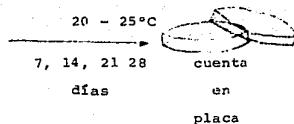
PRUEBA DE EFECTIVIDAD PRESERVATIVA ( U. S. P. XX )

(0.1 ml  $1 \times 10^8$  moos./ml. )

20 ml.



+ Pseudomona aeruginosa  
+ Escherichia coli  
+ Staphylococcus aureus  
+ Candida albicans  
+ Aspergillus niger



Se cumple con la prueba si:

- 1.- 100% de reducción del crecimiento de los microorganismos al 7o. día.
- 2.- La concentración bacteriana a los 14 ó 28 días  $<$  del 0.1% de la concentración inicial
- 3.- La concentración de levaduras y mohos a los 14 ó 28 días  $<$  a la concentración inicial.

## 9.- RESULTADOS

9.1.- Lotes de solución inyectable de sulfato de gentamicina.

a) Lotes sin bisulfito de sodio.

TABLA No. VII

Lote	Propilparabenc		Metilparabenc		pH	APE Test.
	mg/ml	%	mg/ml	%		
1	---	---	---	---	4.5	cumple
2	---	---	---	---	4.5	cumple
3	0.019	9.5	0.51	39.2	4.6	cumple
4	0.019	9.5	0.50	38.5	4.6	cumple
5	0.043	21.5	1.05	80.8	4.6	cumple
6	0.042	21.0	1.03	79.2	4.6	cumple
7	0.190	95.0	1.41	108.4	4.6	cumple
8	0.190	95.0	1.37	105.4	4.6	cumple

Resultados de APE test para los lotes de sulfato de gentamicina con variación de conservadores y sin bisulfito de sodio.

Lote	7° DIA					14° DIA					21° DIA					28° DIA					APE test.	
	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger		
1	100	100	100	0.0	0.0					100	99.3										*	
2	100	100	100	0.0	0.0					100	99.5										*	
3	100	100	100	100	100																*	
4	100	100	100	100	100																*	
5	100	100	100	100	100																*	
6	100	100	100	100	100																*	
7	100	100	100	100	100																*	
8	100	100	100	100	100																*	
9																						
10																						
11																						
12																						
13																						
14																						

\* cumple la prueba

\*\* NO cumple la prueba

% de reducción microbiana en los lotes de Solución inyectable de sulfato de gentamicina con variación de conservadores y sin bisulfito de sodio.



b) Lotes sin parabenos

TABLA No. IX.

Lote	Bisulfito de sodio SO <sub>2</sub> mg/ml	%	pH	Sulfato de gentamicina mg/ml.	APE Test
1	---	---	4.5	10.15	cumple
2	---	---	4.5	9.96	cumple
3	0.49	24.8	3.7	10.36	cumple
4	0.53	26.9	4.8	9.90	cumple
5	0.96	46.7	3.0	10.45	cumple
6	0.98	49.7	3.0	9.85	cumple
7	1.59	80.7	3.0	9.64	cumple
8	1.61	81.7	2.9	9.57	cumple
9	1.95	98.9	2.5	10.00	cumple
10	1.94	98.5	2.0	10.04	cumple

Resultados de APE Test para los Lotes de sulfato de gentamicina con variación de bisulfito de sodio y sin parabenos.

Lote	7° DIA					14° DIA					21° DIA					28° DIA					APE test.
	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	
1	100	100	100	0.0	0.0				0.0	99.3											*
2	100	100	100	0.0	0.0				0.0	99.5											*
3	100	100	100	100	100																*
4	100	100	100	100	100																*
5	100	100	100	100	100																*
6	100	100	100	100	100																*
7	100	100	100	100	100																*
8	100	100	100	100	100																*
9	100	100	100	100	100																*
10	100	100	100	100	100																*
11																					
12																					
13																					
14																					

\* cumple la prueba

\*\* NO cumple la prueba

‡ De reducción microbiana en los lotes de Solución inyectable de sulfato de gentamicina con variación de bisulfito de sodio y sin parabenos.

c) Lotes placebo de sulfato de gentamicina sin parabenos.

TABLA No. XI

Lote	Bisulfito de sodio SO <sub>2</sub> mg/ml	%	pH	APE Test.
1	---	---	6.7	No cumple
2	---	---	6.8	no cumple
3	0.49	24.8	5.0	cumple
4	0.49	24.8	4.9	cumple
5	1.01	51.2	3.6	cumple
6	0.99	50.2	5.0	cumple
7	1.59	80.7	5.7	cumple
8	1.61	81.7	5.5	cumple
9	1.97	100.0	5.0	cumple
10	1.95	98.9	4.1	cumple

Resultado de APE Test para los Lotes placebo de sulfato de gentamicina sin parabenos.

## CUENTA MICROBIANA

TABLA XII

Lote	7° DIA					14° DIA					21° DIA					28° DIA					APE test.	
	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger		
1		HUBO	CRECIMIENTO	MICROBIANO	A LO LARGO	DE LA PRUEBA															**	
2		HUBO	CRECIMIENTO	MICROBIANO	A LO LARGO	DE LA PRUEBA																**
3	100	100	100	100	100																	*
4	100	100	100	100	100																	*
5	100	0.0	100	100	100		99.9															*
6	100	0.0	100	100	100		100															*
7	100	0.0	100	100	100		100															*
8	100	99.6	100	100	100		99.9															*
9	100	99.6	100	100	100		99.9															*
10	100	99.6	100	100	100		99.9															*
11																						
12																						
13																						
14																						

\* cumple la prueba

\*\* NO cumple la prueba

‡ De reducción microbiana en los lotes placebo de sulfato de gentamicina, sin prabenos.

TABLA No. XIII

Lote	Alcohol bencílico		Metilparabeno		Propilparabeno		pH	APE Test
	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%		
1	---	----	---	----	---	----	7.1	no cumple
2	9.1	101.4	---	----	---	----	7.4	cumple
3	9.0	100.1	---	----	---	----	7.3	cumple
4	6.6	73.3	---	----	---	----	7.3	cumple
5	6.7	74.1	---	----	---	----	7.3	cumple
6	8.7	96.6	1.29	99.5	0.183	93.2	7.2	cumple
7	6.8	75.6	0.95	73.0	0.145	72.6	7.4	cumple
8	6.8	75.3	0.95	73.0	0.143	71.5	7.4	cumple
9	4.3	47.9	0.66	50.7	0.096	48.0	7.2	cumple
10	4.3	47.9	0.66	50.7	0.096	48.0	7.2	cumple
11	2.2	24.2	0.33	25.4	0.047	23.5	7.2	cumple
12	2.2	24.2	0.33	25.4	0.047	23.5	7.2	cumple
13	---	----	1.30	100.0	0.197	98.0	7.2	cumple
14	---	----	1.30	100.0	0.187	93.7	7.1	cumple

Resultado de APE Test para los lotes de suspensión inyectable de Betametasona dipropionato y betametasona fosfato de sodio con variación en la concentración de conservadores.

9.2. - LOTES DE SUSPENSIÓN INECTABLE DE BETAMETASONA DIPROPIONATO Y BETAMETASONA FOSFATO DE SODIO.

TABLA No. XIV  
CUENTA MICROBIANA

Lote	7° DIA					14° DIA					21° DIA					28° DIA					APE test.
	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	
1					HUBO	CRUCI	MIENTO	MICROB	IANO	A LO	LARGO	DE LA	PRUEBA								**
2	100	0.0	100	92.9	0.0		0.0		100	100		99.9									*
3	100	0.0	100	100	0.0		0.0			0.0		100				99.9					*
4	100	0.0	100	99.2	0.0		0.0		100	0.0		0.0				97.1		99.9			*
5	100	100	100	100	0.0					86.0						100					*
6	100	100	100	100	100																*
7	100	100	100	100	100																*
8	100	100	100	100	100																*
9	100	100	99.8	0.0	0.0			100	96.5	99.9											*
10	100	100	100	99.5	99				100	99.9											*
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100	99.7	100	100	99.5		99.9									*
12	99.2	99.7	99.8	55.6	63.9	99.9	99.9	100	99.5	99.7											*
13	100	0.0	100	100	100		0.0					0.0						99.9			*
14	100	100	0.0	0.0	99.9			100	100	100											*

\* cumple la prueba

\*\* NO cumple la prueba

‡ De reducción microbiana en los lotes de suspensión inyectable de dipropionato de betametasona-fosfato sódico de betametasona, con variación de concentración de conservadores.

TABLA No. XV

Lote	Alcohol bencílico		Metilparabeno		Propilparabeno		pH	APE Test
	mg/ml	%	mg/ml	%	mg/ml	%		
1	---	----	---	----	---	----	7.2	no cumple
2	8.6	95.9	---	----	---	----	7.6	cumple
3	9.3	103.2	---	----	---	----	7.7	cumple
4	7.3	81.1	---	----	---	----	7.6	cumple
5	6.9	76.6	---	----	---	----	7.7	cumple
6	8.9	98.8	1.78	98.8	0.188	94.0	7.3	cumple
7	6.8	75.6	1.28	71.1	0.145	72.5	7.4	cumple
8	6.8	75.6	1.30	72.2	0.149	74.5	7.4	cumple
9	4.7	52.5	0.87	48.3	0.102	51.0	7.4	cumple
10	4.6	51.1	0.86	47.7	0.094	47.0	7.4	cumple
11	2.2	24.8	0.44	24.3	0.046	23.2	7.5	cumple
12	2.3	25.2	0.43	24.0	0.049	24.5	7.5	cumple
13	---	----	1.68	93.3	0.198	99.0	7.3	cumple
14	---	----	1.83	101.6	0.200	100.0	7.2	cumple

Resultados de APE Test para los lotes de suspensión inyectable de acetato de prednisolona con variación de conservadores.

TABLA XVI

## CUENTA MICROBIANA

Lote	7° DIA					14° DIA					21° DIA					28° DIA					APE test.
	Pseud aerug coli	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug coli	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug coli	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	Pseud aerug coli	Esch. coli	Staph aureu	Cand. albic	Asper niger	
1				HUBO		CRECIMIENTO MICROBIANO A LO LARGO DE LA PRUEBA															**
2	100	100	100	100	100																*
3	100	0.0	100	100	100		0.0					100									*
4	100	100	100	100	100																*
5	100	0.0	100	100	100		99.9														*
6	100	100	100	100	100																*
7	100	0.0	100	100	100		0.0					100									*
8	100	100	100	100	100																*
9	100	100	100	100	100																*
10	100	0.0	100	99.9	100		0.0		100			100									*
11	100	100	100	99.8	99.7				100	100											*
12	100	0.0	100	100	99.9		0.0			100		100									*
13	100	100	100	100	100																*
14	100	0.0	100	100	100		99.9														*

\* cumple la prueba

\*\* NO cumple la prueba

‡ De reducción microbiana en lotes de suspensión inyectable de acetato de prednisolona, con variación de conservadores.



## 10.- DISCUSION DE RESULTADOS

## 10.1.- Formulaciones de gentamicina

Los resultados obtenidos para los diferentes lotes de solución inyectable de sulfato de gentamicina, muestran que:

- En los lotes con parabenos y sin bisulfito de sodio, - (Tabla VII) así como en los lotes en cuya formulación está presente el bisulfito de sodio y sin parabenos (Tabla IX), el efecto antimicrobiano en las formulaciones permanece, manteniendo al medicamento protegido contra el crecimiento microbiano aún a las mínimas concentraciones manejadas, ya que el porcentaje de reducción del crecimiento de los microorganismos, obtenido al cabo de los primeros siete días de prueba es total, (Tablas XI y XII).

- Para el caso de los lotes ensayados, en los cuales la formulación contenía únicamente el activo (sulfato de gentamicina), el crecimiento desaparece a los catorce días de la prueba, plazo que se extendió solo para los microorganismos C. albicans y A. niger (Lotes 1 y 2 de Tabla VIII).

Si bien el antibiótico actúa como conservador en la formulación esta no podría actuar contra C. albicans y A. niger - por ser una levadura y un hongo respectivamente, a los que la gentamicina no inhibe por lo que se piensa, que la acción antimicrobiana se deba, primero a la gentamicina que actúa contra -

las levaduras y hongos (17) y por último al pH de la formulación, que esta en el límite inferior al cual se desarrollan los hongos y levaduras (18).

En el caso de las soluciones placebo sin parabenos (solución de bisulfito de sodio y excipientes) (Tabla XII), se encontró que había actividad antimicrobiana a todas las concentraciones de bisulfito de sodio manejadas.

El bisulfito de sodio es usado como conservador en diferentes productos. Su acción antimicrobiana es debida a la presencia de dióxido de azufre y ácido sulfuroso que se forma del bisulfito de sodio en solución ácida. En concentraciones de -- 200 ppm es efectivo contra muchas bacterias, hongos y levaduras (17). Aunque en nuestra formulación el bisulfito de sodio no fue incluido para tener la función conservador, sus propiedades químicas explican así el porque de los resultados obtenidos.

#### 10.2.- Formulaciones de suspensiones inyectables.

Para los lotes de suspensión inyectable de betametasona se obtuvo que en todas las concentraciones manejadas del sistema conservador, formado por alcohol bencílico, metilparabeno y propilparabeno, la actividad antimicrobiana fue efectiva. (Tabla XIII).

En este caso es posible creer que si el sistema conservador disminuyera a lo largo del tiempo hasta un 25%, el medicamento aún permanecería protegido al riesgo de la contaminación microbiana. En el caso del uso de parabenos, sin alcohol bencílico, se obtuvo que la reducción del crecimiento microbiano no fue completa en los primeros días de la prueba excepto para E.coli que disminuyó sólo hasta el último día del ensayo. (Lote 13 Tabla XIV).

Para la formulación que tiene alcohol bencílico sin -- parabenos, la reducción del crecimiento de los microorganismos es aceptable aún hasta una concentración del 75% del agente -- conservador. (Lotes 2,3,4,5 Tabla XIV).

Nuevamente el microorganismo que más resistencia demostró fue E. coli.

Las diferentes concentraciones del sistema conservador probadas en la formulación de la suspensión inyectable de acetato de prednisolona, resultaron ser efectivas para la protección antimicrobiana del medicamento. Así también el uso de -- alcohol bencílico y los parabenos por separado mostraron ser -- igualmente efectivos.

A diferencia de los resultados obtenidos para los lotes de la formulación de betametasona (Tabla XV), en los cuales -- las concentraciones de los conservadores fueron similares, el

efecto antimicrobiano fue más marcado para los lotes de prednisolona (Tabla XVI). Esto se debe a que el tipo de formulación es diferente aunque el sistema conservador sea igual. Se ha demostrado que la actividad de los conservadores disminuye al estar en combinación con macromoléculas tales como el polietilenglicol y polisorbatos (19), mismos que son parte de la formulación de la suspensión de betametasona y que no se encuentran en la suspensión de acetato de prednisolona.

## 11.- CONCLUSIONES

- La concentración de conservadores en la solución de sulfato de gentamicina, como en cualquier otro medicamento, podría disminuir por diferentes razones, sin que ésto llegue a afectar al medicamento en cuanto a su protección antimicrobiana, ya que el antioxidante mostró ser un efectivo conservador aún a bajas concentraciones, así también el activo con el antioxidante y sin él dan protección a la formulación. Por lo que se puede decir, que este medicamento sin su sistema de parabenos es autopreservable.

- Para dos formulaciones distintas, en este caso una suspensión de betametasona y otra de prednisolona, en las cuales el sistema conservador es igual, el efecto antimicrobiano es diferente.

- El alcohol bencílico y los parabenos dan por separado una buena actividad antimicrobiana en las suspensiones de prednisolona y de betametasona, por lo que es posible usar únicamente alguno de los mismos como único componente de su sistema conservador involucrando con ello menor costo y facilidad en la manufactura del producto.

- Es posible disminuir el sistema conservador hasta el 25% para las suspensiones ensayadas y hasta el 100% en la solución de sulfato de gentamicina sin que por ello el producto su

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

fra de contaminación microbiana.

- La correlación entre la concentración de los conservadores y la prueba de APE Test mostró que el efecto antimicrobiano disminuyó conforme la concentración era menor.

- Los microorganismos de prueba disminuyeron su crecimiento en proporción distinta, siendo E. Coli y A. niger los microorganismos de mayor resistencia a la actividad antimicrobiana de los conservadores usados.

## 12.- BIBLIOGRAFIA

- (1) Remington's Pharmaceutical Sciences, 15a. ed. Philadelphia, College of Pharmacy and Sci.
- (2) Lachman, L., The Theory and Practice of Industrial Pharmacy, 2a. ed. Lea Febiger, Philadelphia, 1976, P. 232, 552.
- (3) Breach, G. D. y Reinstein, S.A., en Helman J.
- (4) Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, 4a. ed. México, 1984, P. 103.
- (5) Helman, J. Farmacotecnia Teórica y Práctica, vol. 5, - Ed. CECSA, México, 1981. P. 1485-1487.
- (6) Kogoshi, T.G.L.C. and H.P.L.C. Determination of Therapeutic Agents, Part 2, Ed. Marcel Dekker, Inc. N.Y., - 1978 P. 807-930.
- (7) Kenneth, S.A. and Paruta, A.N.J. Pharm. Sci., 65, 6, 851 (1976)
- (8) Sykes, H.L. and Mercer, N.H., J. Pharm. Sci., 50, 4, 316 (1961).
- (9) Rye D.J., J. Pharm Sci. 53, 1189 (1964)

- (10) Lachman, L. and Cooper, J., *J. Pharm. Sci.*, 51, 3, 305 (1962).
- (11) Bolle, A. and Mirimanof, A., *J. Pharm. and Pharmacol.*, - 2, 685 (1950)
- (12) Sokob H.C. and Cadwallader, D.E., *J. Pharm. Sci.* 56, - 169 (1964)
- (13) Gupta, D.V., *J. Pharm., Sci.*, 68, 908 (1979)
- (14) Salgado, J.M., Soberón, et al., *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 14, 4, (1983)
- (15) Paisano, F.D. and Kostenbänder, H.B., *J. Soc. Cosmtic Chem.*, 10, 383 (1959).
- (16) Información escrita confidencial. Gutiérrez, A.G., - "Influencia de la concentración de dos conservadores sobre la efectividad de su actividad preservativa en soluciones inyectables". Scheramex, S.A. de C.V., México, - 1983.
- (17) Martindale, *The Extra Pharmacopeia*, 28 ed. The Pharmaceutical Press London 1982.
- (18) Fergusen, B. and Durward, N.J. *Pharm. Sci.*, 53, 7, 769 (1964).



- (19) Syemour, M. B. and Sayed, S.; J. Pharm. Sci., 50, 15, - 441 (1961)
- (20) Connors, A. Kennet, Chemical Stability of Pharmaceuti-- cals, Ed. Wiley Interscienc., U.S.A., 1974, P. 307-310.
- (21) Kamada, A., Yata. N. etal. Chem. Pharm. Bull, 21, 2073, (1973)
- (22) Lachman, L. and Seymour, W., J. Pharm. Sci., 52, 244 - (1963)
- (23) Higuchi, T., Patel, E.R., J. American Pharm. Ass. Sci, 41, 293 (1952)
- (24) Prickeit, H. and Mercer, N.H., J. Pharm. Sci., 50, 4, 316 (1964)
- (25) Hess, H. and Spiser, J. Pharm. and Pharmacol, 11, 650 (1959)
- (26) Donato, J.S., J. Pharm. Sci., 54, No. 6 917 (1965)
- (27) Allawala, A., and Riegelman, S., J. Am. Pharm. Assoc. Sci., 43, 93 (1954).
- (28) Garret, E.R., J. Pharm. Pharmacol, 18, 589 (1966)
- (29) Kamada, A., Yata, N., et. al., Chem. Pharm. Bull, 21, 2073 (1973)

- (30) Kostenbauder, H. B., J. Pharm. Sci., 53, 9, 1027  
(1964)
- (31) Lachman, L. and Cooper, J., J. Pharm. Sci., 52, 2, 241  
(1963)
- (32) U.S. Pharmacopeia, National Formulary, 20 ed. U.S.A.,  
1980 P. 813