

19  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

“ESTUDIOS DE REFORMULACION DE UNA  
SOLUCION OFTALMICA DE NEOMICINA,  
POLIMIXINA Y GRAMICIDINA”

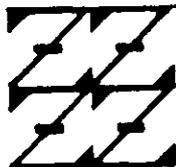
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

**GERARDO ENCISO PRADO**

U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A



LO HUBIERO S I J E  
D E N U E S T R A D E F E S I O N

MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

259577



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**SINODALES ASIGNADOS**

**PRESIDENTE:** *Q.F.B. MAURO ARRIETA SANCHEZ.*

**VOCAL:** *Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES.*

**SECRETARIO:** *Q.F.B. FRANCISCA ROBLES LOPEZ.*

**SUPLENTE:** *Q.F.B. A. GUILLERMINA ROJAS FERNANDEZ.*

**SUPLENTE:** *Q.F.B. MARICRUZ VILLEGAS SOLIS.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por bendecirme con su amor,  
por darme la vida y la oportunidad  
de concluir una etapa más de este  
largo y difícil camino.

A mi esposa Alma Rocío, por su apoyo  
y su comprensión, pero sobre todo  
por su amor. Para que con nuestro  
amor superemos las adversidades,  
y sigamos construyendo nuestro  
hogar y nuestra vida.

A Luis Gerardo y Alma Neli, mis hijos,  
dos de las más grandes bendiciones que he  
recibido de Dios, y quienes son el motivo  
de mi superación.

A mis padres y hermana, por su  
apoyo y estímulo para realizar mis  
estudios y la conclusión de mi  
carrera. Por la gran familia que  
siempre hemos formado. Gracias  
por su amor.

De manera especial para el Ing. Victor  
Fregoso, y la QBP. Patricia Alvarez,  
por su apoyo para la realización del  
presente trabajo.

# TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	1
2. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	4
2.1 Soluciones.....	4
2.2 Estabilidad del fármaco en solución.....	8
2.2.1 Efecto del pH.....	8
2.2.2 Efecto de la temperatura.....	11
2.2.3 Efecto de la catálisis.....	12
2.2.4 Efecto de la fuerza iónica y la constante dieléctrica.....	13
2.2.5 Efecto de la luz.....	16
2.2.6 Efecto oxígeno-aire-óxido-reducción.....	17
2.3 Características de los principios activos de la solución.....	18
2.3.1 Sulfato de Polimixina B.....	19
2.3.2 Sulfato de Neomicina.....	20
2.3.3 Gramicidina.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. OBJETIVOS.....	25
5. HIPOTESIS.....	26
6. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
6.1. Material.....	27
6.2. Equipo.....	27
6.3. Instrumentos.....	28
6.4. Reactivos.....	28
6.5. Metodología.....	29
6.5.1. Preparación de las soluciones.....	29
6.5.2. Valoración microbiológica de Neomicina.....	34
6.5.3. Valoración microbiológica de Polimixina B.....	36
6.5.4. Valoración microbiológica de Gramicidina.....	38
7. RESULTADOS Y DISCUSION.....	41
7.1. Efecto del pH.....	41
7.2. Efecto sobre la Valoración.....	46
7.3. Análisis Estadístico.....	51
8. CONCLUSIONES.....	60
9. ANEXO I.....	62
10. BIBLIOGRAFIA.....	77

## 1. INTRODUCCION

En la Industria Farmacéutica es una preocupación constante la elaboración de medicamentos los cuales proporcionen el efecto terapéutico deseado, además de la satisfacción plena de las necesidades del paciente. Teniendo como principio lo anterior, y trabajando específicamente en el área de medicación oftalmológica, se realizó el presente trabajo, el cual intenta mejorar la formulación y estabilidad de una solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina mediante la incorporación de un sistema amortiguador más efectivo que el utilizado actualmente; ya que la concentración del ión hidrógeno en una solución puede tener un efecto considerable sobre la acción terapéutica, la conformidad del paciente, y la estabilidad y solubilidad de los principios activos en la misma solución.

Considerando además, que algunos de los principios activos tienen una marcada influencia sobre el pH de la solución oftálmica, es importantísimo por lo tanto, que estas soluciones oftálmicas cuenten con un sistema de amortiguamiento que sea capaz de proporcionar a dichas soluciones una estabilidad adecuada; evitando de esta manera posibles precipitaciones, deterioramiento o inactivación de los principios activos.

Por otro lado, la máxima comodidad, o la menor irritación para el paciente, se espera que se encuentre en el pH normal del fluido lagrimal, el cual es aproximadamente 7.4; sin embargo, el rango más recomendable, y en el que no se producen alteraciones del fluido lagrimal, ni irritación o molestia en el paciente se encuentra entre 6 y 8 (en algunos casos el pH puede variar desde 3.5 hasta 8.5).

La razón de estas variaciones está justificada por el hecho de que muchos principios activos son sustancialmente inestables cuando son almacenados en soluciones con pH neutro o ligeramente alcalino, lo cual podría ser desfavorable para producir el máximo efecto terapéutico y la mínima irritación. Existen también fármacos que son utilizados en soluciones oftálmicas y no son suficientemente solubles en el pH de máximo efecto terapéutico y/o conformidad. Desde la formulación entonces, o en la reformulación debemos considerar estos factores y tratar hasta donde sea posible, que el pH final de la solución oftálmica se encuentre dentro del rango de mayor efecto terapéutico o muy cercano a él.

Por este motivo, en conjunto con el departamento de Desarrollo se evaluó la necesidad de incorporar un sistema amortiguador a la solución oftálmica, en el que las variaciones de pH que pudieran presentarse se

encontraran dentro de un rango menor al que marca la especificación oficial (4.7 a 6.0). Con este fin, se prepararon tres diferentes sistemas amortiguadores para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina; los cuales se evaluaron contra el sistema amortiguador de la fórmula registrada y un sistema de control o de referencia, en el que no se incorporó sistema amortiguador alguno a la solución.

Para ayudar a determinar el mejor sistema se realizó un análisis de varianza evaluando el efecto del tiempo, tanto sobre el pH como sobre la valoración de cada uno de los activos que componen la fórmula, considerando que la variación que pudiera existir debería ser menor a la que presenta el actual sistema y sin afectar la estabilidad de la misma solución.

## 2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

### 2.1 Soluciones.

Las soluciones son preparaciones líquidas que contienen una o más sustancias químicas disueltas, esto es, molecularmente dispersas, en un solvente o mezcla de solventes mutuamente miscibles. Debido a que en las soluciones las moléculas están uniformemente dispersas, su uso como formas de dosificación, generalmente asegura la uniformidad en la administración de la dosis además de una buena precisión cuando se diluye o mezcla con otras soluciones.

Las soluciones de acuerdo a su vía de administración se clasifican en:

- ◆ *Soluciones orales*
- ◆ *Soluciones tópicas*
- ◆ *Soluciones óticas*
- ◆ *Elixir*
- ◆ *Tinturas*
- ◆ *Aguas aromáticas*
- ◆ *Soluciones oftálmicas*

◆ *Soluciones orales.* Son preparaciones líquidas para administración oral que contienen una o más sustancias, con o sin agentes saborizantes, colorantes o

edulcorantes disueltos en agua, o de cosolventes en agua. Las soluciones orales pueden ser formuladas para administración oral directa del paciente, o pueden ser dispensadas en una o más formas concentradas, que deben ser diluídas previamente a la administración.

◆ *Soluciones tópicas.* Son soluciones generalmente acuosas, pero frecuentemente contienen otros solventes como alcohol y polioles para ser aplicadas en la piel o en la superficie de la mucosa.

◆ *Soluciones óticas.* Son soluciones acuosas, o soluciones preparadas con glicerina u otros solventes y agentes dispersantes para ser aplicados en el oído externo.

◆ *Elixir.* Son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas de sustancias volátiles preparadas por disolución simple de los ingredientes o por la adición de una mezcla de ingredientes para su disolución.

◆ *Tinturas.* Son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas preparadas de materias primas vegetales o sustancias químicas. La proporción del fármaco presente en la tintura no es uniforme, pero varía de acuerdo a los estándares establecidos para cada una de ellas.

◆ *Aguas aromáticas.* Son soluciones acuosas claras, saturadas de aceites volátiles u otras sustancias aromáticas o volátiles.

◆ *Soluciones oftálmicas.* Son soluciones estériles esencialmente libres de partículas extrañas, preparadas y empacadas para su aplicación en el ojo. Entendiéndose como productos estériles aquellas formas de dosificación de agentes terapéuticos que se encuentren libres de microorganismos viables; por lo tanto, todos los componentes y procesos involucrados en la preparación de los productos estériles deben ser seleccionados y diseñados para eliminar todo tipo de contaminación, ya sea física, química o de origen microbiológico.

Para este tipo de medicación oftalmológica las soluciones acuosas son las más comunmente utilizadas debido a su facilidad de aplicación y a que prácticamente no producen reacciones adversas, ya que el vehículo no causa interferencia con la visión ni mucho menos interfiere con la regeneración del epitelio de la córnea (1).

De manera general las soluciones acuosas se ven afectadas por una serie de factores o variables, las cuales incluyen:

- a. La concentración del fármaco en el vehículo.
- b. La viscosidad del vehículo.
- c. La tensión superficial.
- d. El pH.
- e. Influencia del movimiento lagrimal y el drenado de la dosis colocada.
- f. Las características de absorción y eliminación del fármaco.

También debe considerarse que, los solutos utilizados en la preparación de soluciones oftálmicas, deben ser incorporados para incrementar la estabilidad del producto, además de estar libres de contaminación microbiana(2). Estas sustancias se han dividido de acuerdo a su función, e incluyen:

- Solubilizantes
- Antioxidantes
- Buffers o amortiguadores
- Agentes quelantes
- Agentes antibacterianos
- Agentes fungicidas
- Inhibidores de hidrólisis
- Antiespumantes
- Sustancias para propósitos especiales

## *2.2 Estabilidad del fármaco en solución.*

Es sabido que con el tiempo, cualquier sistema sufre cambios debido a distintos factores, y constituye una buena práctica la prevención de los mismos para mantener a aquel en la integridad de sus propiedades y composición, a fin de lograr el efecto deseado(3).

La estabilidad de un fármaco en solución depende no solamente de la naturaleza química del fármaco y el solvente utilizado, sino frecuentemente también del pH de la solución, la temperatura alcanzada durante la preparación y el almacenaje, el grado de exposición a la luz y al aire, y la presencia o ausencia de otros constituyentes(1).

### *2.2.1. Efecto del pH.*

La velocidad de degradación de muchos fármacos en solución está estrechamente ligada al pH, el cual quizá sea el factor más importante a tener en cuenta para asegurar la máxima estabilidad de los medicamentos.

Para la estabilización, el punto isocatalítico, es decir, el pH correspondiente a la velocidad de degradación mínima, tiene una importancia práctica grande. Si este pH óptimo de estabilidad concuerda con el pH fisiológico, se habrá conseguido la condición

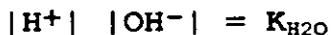
ideal para un medicamento parenteral. Desgraciadamente, este pH, que corresponde al de máxima estabilidad, no coincide sino en pocas ocasiones con las exigencias fisiológicas. Sin embargo, es preciso elegir un pH que pueda soportarlo el organismo y que asegure a la vez una adecuada estabilidad del producto.

La velocidad de degradación a temperatura constante en soluciones acuosas depende principalmente de dos factores:

*Primero. Del grado de ionización del principio activo en solución, y*

*Segundo. De la concentración de los iones  $|H_3O^+|$  y  $|OH^-|$  que participan en la descomposición catalítica del principio activo.*

Resulta interesante estudiar como la actividad de los iones  $H^+$  y  $OH^-$  está relacionada con los principios activos de la solución, los electrólitos del sistema amortiguador y la ionización del agua (3). Teniendo en cuenta que el agua está compuesta por cantidades iguales de  $OH^-$  y  $H^+$ , y que la actividad de éstos esta ligada a la constante de ionización del agua.



Hablando de sistemas amortiguadores debemos mencionar lo que significa la acción *buffer* o acción amortiguadora, la cual según J.G.Dick "es la acción de una sustancia, o una mezcla de sustancias, adicionadas a una solución, generalmente de naturaleza acuosa, la cual ayuda a estabilizar y mantener un valor específico de pH en la solución" (4).

Así, una solución amortiguada tiende a resistir cambios en el pH que podrían generalmente ser el resultado de la adición de pequeñas cantidades, ya sea de un ácido fuerte o de una base fuerte. Si bien, ocurren cambios de pH en soluciones amortiguadas como resultado de la adición de estos ácidos o bases fuertes, los cambios son insignificantes en comparación con aquellos resultados en circunstancias similares con soluciones no amortiguadas.

Las soluciones amortiguadoras generalmente involucran mezclas de ácidos débiles y la sal del ácido débil, bases débiles y la sal de la base débil, o una sal de un ácido-base polibásico como el ftalato ácido de potasio.

La capacidad amortiguadora es generalmente definida como el número de moles de base fuerte requerida para cambiar el pH de un litro de solución por una unidad(4,5,6).

### 2.2.2. Efecto de la temperatura.

El aumento de la temperatura produce frecuentemente un marcado aumento de la velocidad de reacción; para reacciones en solución una generalización útil es que la velocidad se duplica por un aumento de 10 °C en la temperatura. A 120 °C (temperatura de esterilización), la ionización del agua es mayor (aproximadamente 560 veces más que a la temperatura ordinaria), y la posibilidad de inestabilidad de los solutos es muy evidente.

La constante de acidez o basicidad (pK) de los principios activos se modifican también con la temperatura. A 100 °C los valores de pK disminuyen de 1.4 a 2 unidades. A 120 °C, por el contrario, el comportamiento de muchos principios activos no está bien dilucidado. Se conoce sin embargo, el comportamiento a 100 °C de algunos sistemas amortiguadores, y puede permitirse una extrapolación a 120 °C. Hay sistemas amortiguadores en que el pH no cambia en función de la temperatura (sistemas de pH termoconstante). El pOH por el contrario, disminuye marcadamente a medida que la temperatura aumenta, es decir, hay un incremento de la actividad de los iones OH<sup>-</sup>. Por ejemplo, en el caso de los ftalatos, acetatos, fosfatos, boratos y tartratos.

### 2.2.3. Efecto de catálisis.

Los fenómenos de oxidación que se producen en una solución pueden ser catalizados por metales como el cobre, hierro o manganeso. Estas trazas de metales pueden tener su origen en: el mismo fármaco, el solvente e incluso el recipiente. Es difícil obtener los excipientes o principios activos libres de trazas metálicas, su tenor es, en general, de algunas ppm.

Si los metales no están al estado libre, sino acomplejados por una sustancia apropiada, se elimina el poder catalítico. Hay diferentes sustancias que actúan como acomplejantes o quelantes. Uno de los más empleados es el EDTA- $\text{Na}_2$  (etilendiaminotetraacetato disódico); éste se usa como estabilizador en los casos en que metales pesados (Cu, Mn, Fe) causan o aceleran catalíticamente la oxidación de los principios activos en solución. Como cada preparación presenta múltiples posibilidades de reaccionar, el agregado de cantidad apropiada de EDTA no puede calcularse y se determina por ensayos a concentraciones crecientes.

Otras sustancias que actúan como quelantes son: el ácido cítrico, el ácido tartárico y sus sales.

#### 2.2.4. Efecto de la fuerza iónica y la constante dieléctrica.

La fuerza iónica se define como la semisuma del término obtenido multiplicando la concentración de las especies iónicas presentes en la solución por su valencia elevada al cuadrado. Graficando el logaritmo de la velocidad de reacción en función de la raíz cuadrada de la fuerza iónica, puede determinarse si un incremento en la fuerza iónica, aumenta, reduce o no tiene efecto en la velocidad de degradación.

La concentración de la sal empleada en la preparación líquida puede incrementar o disminuir la velocidad de degradación del fármaco en la solución o no tener efecto. Cuando el fármaco se carga positivamente y está bajo los efectos de la catálisis de iones  $H^+$ , se produce un incremento en la fuerza iónica causada por el agregado de una sal, tal como el  $NaCl$ , que produce un incremento en la velocidad de degradación. Se produce una disminución en la velocidad de degradación si el fármaco cargado positivamente está catalizado por iones  $OH^-$  y la fuerza iónica se incrementa por el agregado de una sal. Si el fármaco que sufre la degradación es una molécula neutra, cambia su fuerza iónica por el agregado de una sal, pero podría no tener efecto en la velocidad de degradación.

El efecto de la constante dieléctrica sobre la constante de velocidad de una reacción iónica extrapolada a dilución infinita, donde el efecto de la fuerza iónica es nulo, es importante en la preparación de medicamentos. Una ecuación que relaciona estos términos es la siguiente:

$$\ln k = \ln k_{\epsilon=\infty} - \frac{NZ_A Z_B e^2}{RT r^*} \frac{1}{\epsilon}$$

Donde:

$k_{\epsilon=\infty}$  = la constante de velocidad en un medio de constante dieléctrica infinita,

$N$  = es el número de Avogadro,

$Z_A Z_B$  = cargas de los dos iones,

$e$  = es la carga eléctrica elemental,

$r^*$  = el radio del complejo activado y

$\epsilon$  = es la constante dieléctrica de la disolución (que es casi la constante dieléctrica del solvente en soluciones diluidas).

El término  $\ln k_{\epsilon=\alpha}$  se obtiene representando gráficamente el  $\ln k$  frente a  $1/\epsilon$  y extrapolando a  $1/\epsilon = 0$ , es decir, para  $\epsilon=\alpha$ , esto debería dar una línea recta con pendiente positiva si los iones son de carga opuesta, y negativa si son del mismo signo. En una reacción entre iones de signo opuesto, al aumentar la constante dieléctrica del disolvente disminuye la constante de velocidad de la reacción.

Cuando la reacción es entre una molécula dipolar y un ión A, la ecuación es:

$$\ln k = \ln k_{\epsilon=\alpha} + \frac{N(Z_A)^2 e^2}{2RT} \left( \frac{1}{r_A} - \frac{1}{r^*} \right) \frac{1}{\epsilon}$$

siendo  $Z_A$  la carga del ión A,  $r_A$  su radio y  $r^*$  el radio del complejo activado. Si se representa gráficamente  $\ln k$  en función de la recíproca  $1/\epsilon$  se obtiene una recta. Como  $r^*$ , el radio del complejo activado (molécula-ión), es mayor que  $r_A$ , el término de la derecha será siempre positivo. El  $\ln k$  aumentará a medida que  $1/\epsilon$  aumente, es decir la velocidad de reacción entre un ión y una

molécula se incrementa al disminuir la constante dieléctrica del medio, siempre que la fuerza iónica no influya.

Pueden encontrarse desviaciones en las gráficas, y se deben a la orientación de las moléculas del disolvente alrededor del soluto. Y esto ocurre cuando el solvente está compuesto de agua y un líquido de baja constante dieléctrica. Si las moléculas de agua se orientan alrededor del ión o cerca del ión, la constante dieléctrica es mayor que en el resto de la disolución(3).

#### *2.2.5. Efecto de la luz.*

La descomposición de los productos farmacéuticos resultante de la absorción de la energía radiante en la forma de luz adquiere una mayor importancia debido a la estructura química compleja de los nuevos fármacos.

Algunos fármacos cambian rápidamente y su inestabilidad a la luz es muy bien conocida, pero muchas otras sufren una degradación lenta que se cumple sin hacerse ostensible. La luz es energía y a determinada frecuencia puede deteriorar un fármaco de manera independiente de la concurrencia de la temperatura. En general, la degradación se produce por efecto de la radiación ultravioleta o por la intensidad

de la luz, es decir, la energía de los fotones se transmite en ciertas condiciones a una molécula determinada provocando transformaciones en la molécula misma o favoreciendo otros procesos de degradación como sucede en la autooxidación cuyo proceso lo catalizan las radiaciones luminosas.

#### 2.2.6. Efecto oxígeno-aire-óxido-reducción.

La descomposición por efecto del oxígeno es un caso común en los fármacos de uso farmacéutico y alcanza a una cantidad grande de agentes de uso frecuente como por ejemplo, esteroides, vitaminas, antibióticos. Estas reacciones son producidas por radicales libres o por oxígeno molecular, y debido a la complejidad y variedad de los agentes capaces de producirlas es imposible establecer un mecanismo general.

Se dice que una sustancia se oxida si pierde electrones, gana átomos electronegativos o pierde átomos electropositivos. Una forma común de descomposición oxidativa que ocurre en los preparados farmacéuticos es la autooxidación que consta de reacciones en cadena producidas por radicales libres. Los compuestos que se forman en la oxidación y degradación modifican el olor y sabor, sobre todo, si se considera que se forman buena cantidad de productos volátiles; estos son, generalmente, monómeros de cadena

corta que se crean por ruptura del hidroperóxido no volátil, primer producto de la oxidación.

En los productos farmacéuticos se incorporan cierto tipo de sustancias cuya función es prevenir o evitar las mencionadas reacciones de oxidación; tales sustancias reciben el nombre de antioxidantes, las cuales requieren de ciertas características como son:

- ⇒ No debe ejercer influencia nociva sobre la salud.
- ⇒ No debe influir en el color, aroma o gusto del producto.
- ⇒ Debe ser efectivo en bajas concentraciones para no desnaturalizar el producto.
- ⇒ Debe ser fácil de incorporar.

La selección del agente antioxidante debe hacerse a través del potencial redox, sin embargo, las medidas electrométricas no predicen en sistemas complejos la efectividad del antioxidante. Por lo tanto, la forma más apropiada es probarlo en el sistema particular del que se trate, y someterlo enseguida a diferentes ensayos, analizando luego tanto el principio activo como el mismo antioxidante.

### *2.3. Características de los principios activos de la solución.*

Además de los efectos, sobre los productos farmacéuticos antes mencionados, debemos considerar de

manera especial las características físicas, químicas y estabilidad de cada uno de los principios activos que componen la fórmula del producto motivo de estudio.

### 2.3.1. Sulfato de Polimixina B.

La polimixina B es un derivado perteneciente a un grupo de sustancias antibióticas (polimixinas) estrechamente relacionadas, elaboradas por diversas cepas de *Bacillus polymyxa* (7). El sulfato de polimixina B se encuentra como un polvo blanco o ligeramente coloreado e higroscópico, el cual no tiene olor o tiene un débil olor característico.

El fármaco es libremente soluble en agua, y en solución inyectable conteniendo 0.9% de cloruro de sodio; es ligeramente soluble en alcohol. Las soluciones acuosas del sulfato de polimixina B tienen un pH entre 5.0 y 7.5.

El sulfato de polimixina contiene no menos de 6000 unidades de actividad por mg, calculado sobre la base seca, y cada mg de polimixina B pura es equivalente a 10,000 unidades de actividad de polimixina B.

#### *Estabilidad.*

Comercialmente el sulfato de polimixina B se vende como polvo estéril que debe ser protegido de la luz y

almacenado a una temperatura menor a 30 °C. Las soluciones acuosas con un pH entre 5-7.5, pueden ser almacenadas durante 6 a 12 meses a una temperatura entre 2-8 °C sin pérdida apreciable de la potencia; sin embargo alguna porción no utilizada, para uso parenteral, debe ser desechada después de 72 horas. El fármaco no debe ser almacenado en soluciones alcalinas ya que es menos estable.

El sulfato de polimixina B es inactivado por ácidos fuertes o soluciones alcalinas; es químicamente incompatible con muchos fármacos que incluyen: anfotericina B, cefalotina de sodio, succinato sódico de cloramfenicol, clorotiazida sódica, heparina sódica, nitrofurantoina de sodio, penicilinas, fosfato de prednisolona sódica, y tetraciclinas. El sulfato de polimixina B en solución también es incompatible con las sales de calcio y magnesio (8).

### 2.3.2. Sulfato de Neomicina.

La Neomicina es un antibiótico de la familia de los aminoglucósidos propiamente dichos, los cuales son antibióticos de espectro reducido y predominantemente bactericidas, que al igual que la estreptomicina, son glucósidos con 2 o 3 moléculas de azúcares que llevan grupos amínicos (9). Es obtenida del cultivo de *Streptomyces fradiae*, y está formada especialmente por

Neomicina B y pequeñas cantidades de Neomicina C; ambas constituidas por la desoxistreptomina unida a la neosamina C (aminoazúcar) y a la neobiosamina, disacárido formado por la D-ribosa y la neosamina. Debiendo señalarse que en la neomicina C, la neosamina puede ser B o C, estereoisómeros. Comercialmente está constituida casi totalmente de la sal del sulfato de Neomicina C, y se encuentra como un polvo ligeramente amarillo, higroscópico. Es libremente soluble en agua y muy ligeramente soluble en alcohol.

#### *Estabilidad.*

Las preparaciones de sulfato de Neomicina pueden ser decoloradas por la luz, sin embargo, la decoloración no parece afectar la potencia de la actividad del fármaco. Las preparaciones deben ser almacenadas en recipientes resistentes a la luz. Las preparaciones oftálmicas y óticas de la Neomicina deben ser almacenadas a una temperatura entre 15 y 30 °C (8).

#### *2.3.3. Gramacidina.*

La gramacidina es un polipéptido cíclico, sustancia antimicrobiana producida por el desarrollo del *Bacillus brevis*. Puede ser obtenida de la tirotricina, de la cual es uno de los principales componentes.

*Estabilidad.*

Se encuentra como polvo cristalino de color blanco o casi blanco, inoloro. Contiene no menos de 900 mg de Gramicidina por mg, calculado sobre la base seca. Es insoluble en agua, soluble en alcohol. Debe almacenarse en contenedores que la protejan de la exposición al aire.

La gramacidina tiene propiedades similares a las de la tirotricina, y es también tóxica al ser administrada sistémicamente. Ha sido utilizada para el tratamiento local de infecciones susceptibles generalmente en combinación con otros agentes antimicrobianos como la Neomicina y la Polimixina B, y frecuentemente también con corticosteróides (10).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

De manera general, los antibióticos en solución oftálmica son utilizados para el tratamiento de infecciones oculares superficiales tales como: conjuntivitis, queratitis, queratoconjuntivitis, úlcera córnea y algunas otras las cuales son producidas por microorganismos susceptibles a dichos antibióticos. Específicamente la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina es utilizada para el tratamiento de infecciones superficiales de los ojos que involucran la conjuntiva y la córnea, las cuales son causadas por microorganismos susceptibles, principalmente *Ps. aeruginosa*.

La Industria Farmacéutica como ya lo hemos mencionado, tiene el compromiso de ofrecer a sus clientes constantemente productos de mejor CALIDAD, que sean además SEGUROS y ESTABLES, por lo que en el departamento de Desarrollo se buscó mejorar la formulación del producto "Neomicina, Polimixina y Gramicidina" solución oftálmica, ya que se observó que el pH de la solución tenía una tendencia a disminuir, aún cuando éste se encuentra dentro de la especificación oficial y ha mostrado ser estable durante periodos de tiempo mayores incluso que la fecha de caducidad del medicamento. Sin embargo, se intentó

que la solución contase con un mejor sistema de amortiguamiento en el cual los cambios en el pH que pudieran presentarse fueran menores a los que se están presentando, esto es, reducir el rango de variación de pH de la solución, y que además de proporcionar estabilidad al producto permitiera una buena aplicación en el ojo sin causar irritación o alguna otra molestia al paciente.

#### 4. OBJETIVOS

1. Seleccionar un nuevo sistema amortiguador para la solución oftálmica de "Neomicina, Polimixina y Gramicidina", el cual sea capaz de mantener las características físicas y químicas de la solución sin alteraciones.

2. Demostrar que el sistema de amortiguamiento o buffer seleccionado, es capaz de mantener el pH de la solución oftálmica dentro de un rango menor al establecido en la especificación oficial, durante un periodo de tiempo no menor a 12 meses.

## 5. HIPOTESIS

El sistema amortiguador a seleccionar no permitirá variaciones considerables de pH dentro del rango oficial establecido para la solución oftálmica, además de mantener la estabilidad del producto.

## 6. PARTE EXPERIMENTAL

### 6.1. Material.

- Matraz balón de fondo plano (5 lts.)
- Vasos de precipitados aforados a 2 y 5 litros.
- Matraz erlenmeyer 1 litro
- Cajas de Petri de 100 mm x 20 mm.
- Tapas de porcelana porosa.

### 6.2 Equipo.

- Tanque de fabricación, acero inoxidable 500 lts. de capacidad, con propela de acero inox. y motor Netco de 1.5 H.P.
- Parrilla de calentamiento y agitación Thermolyne. Modelo 360
- Desmineralizador/Osmosis Inversa Dialquimex modelo 3000.
- Baño de agua s/m.
- Revolver Kraft Instrumentos modelo: S/M.
- Incubadora Blue M modelo: 200A.

### 6.3 Instrumentos.

- Espectrofotómetro U.V./VIS  
Perkin-Elmer modelo: Lambda 1.
- Balanza analítica Sartorius  
modelo: A-702.
- Potenciómetro Beckman  
modelo: 50.
- Lector de zonas de inhibición  
modelo: 290.
- Termómetro de mercurio de inmersión total  
Marca: Brannan. Escala de -20 a 110 °C.

### 6.4 Reactivos.

- Agua de ósmosis inversa
- Fosfato de potasio monobásico R.A. J.T. Baker.
- Fosfato de potasio dibásico R.A. J.T. Baker.
- Medio Antibiótico No. 1 BIOXON.
- Medio Antibiótico No. 10 BIOXON.
- Sulfato de Polimixina B SRef.
- Sulfato de Neomicina SRef.
- Gramicidina SRef.

## 6.5. Metodología.

### 6.5.1 Preparación de las soluciones:

El inicio de la preparación se realizó teniendo en cuenta o considerando la proporción de cada uno de los componentes en la fórmula; es decir, el contenido de principios activos y excipientes (tales como conservadores, antioxidantes, tensoactivos, etc.), los cuales presentamos en la tabla 6.1, y que muestra también el porcentaje de cada uno de ellos en la fórmula.

**TABLA 6.1. Componentes de la fórmula para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina. Los valores aparecen en % y se resaltan en "negritas" los porcentajes de las especies ácidas y básicas probadas en cada solución.**

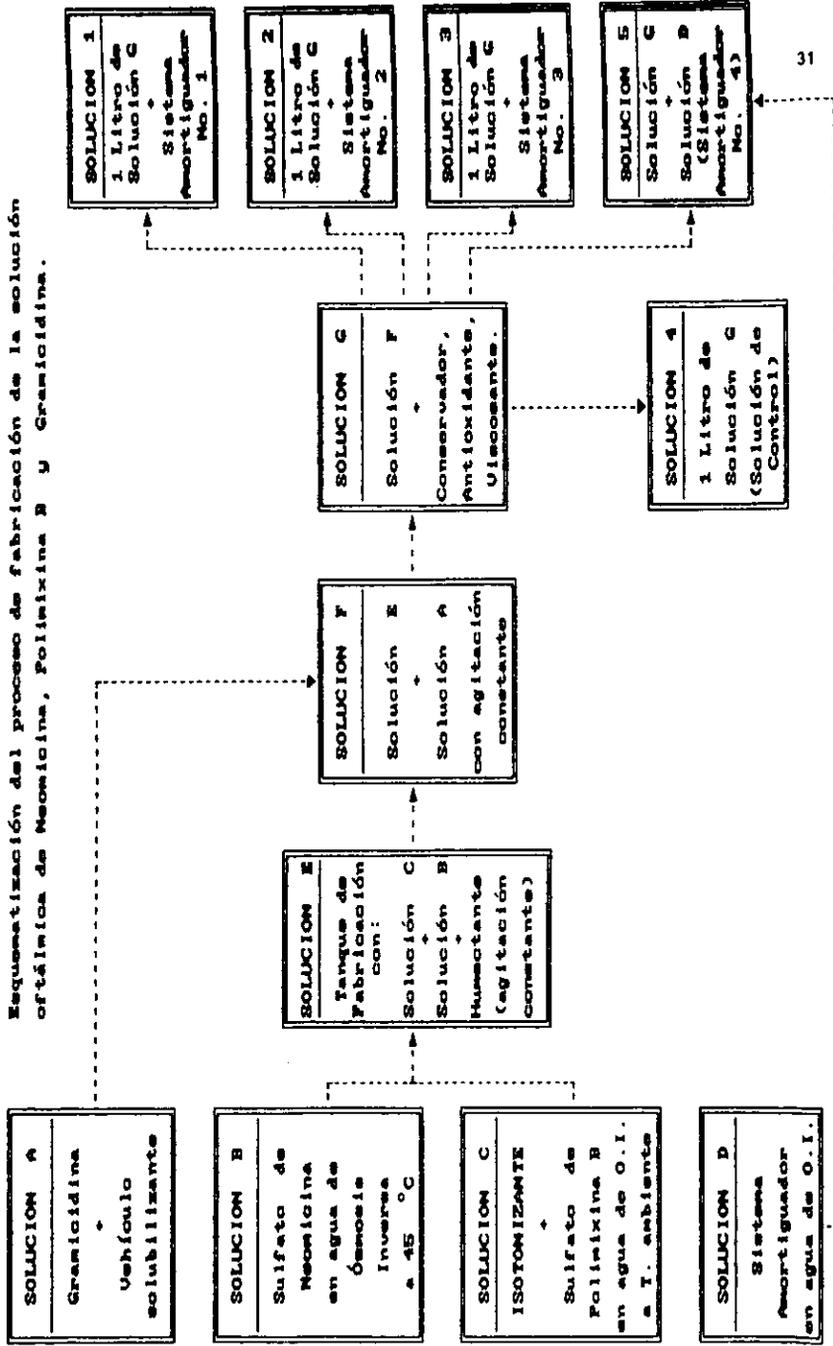
Componentes	SOLUCION				
	1	2	3	4	5
1. Sulfato de Polimixina equivalente a .....	500000 U.I.	500000 U.I.	500000 U.I.	500000 U.I.	500000 U.I.
de Polimixina B.					
2. Sulfato de Neomicina equivalente a .....	0.175	0.175	0.175	0.175	0.175
de Neomicina.					
3. Gramicidina.....	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
4. Isotonizante.....	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
5. Viscosante.....	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
6. Tensoactivo.....	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
7. Especie Ácida.....	<b>0.05</b>	0.75	0.75	(-----)	0.0014
8. Especie básica.....	<b>0.42</b>	<b>0.025</b>	<b>0.005</b>	(-----)	0.45
9. Conservador.....	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
10. Solubilizante.....	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
11. Antioxidante.....	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

En la misma tabla resaltamos las concentraciones probadas de cada uno de las especies que forman los sistemas amortiguadores; el resto de los componentes, como puede observarse se mantienen constantes.

La fabricación propiamente dicha (disolución de los componentes e incorporación de los mismos) se realizó siguiendo el procedimiento estándar de fabricación correspondiente al producto, el cual consistió en un lote estándar de 456 litros, cuyo proceso se muestra en el diagrama de bloques de la figura 1, y consiste en lo siguiente:

1. Solución A. En un matraz balón de fondo plano, colocado sobre una parrilla de agitación, y conteniendo la cantidad indicada de vehículo solubilizante, se disuelve lentamente y con agitación constante la cantidad de Gramicidina indicada en la fórmula.
2. Solución B. En un tanque de acero inoxidable de 50 lts., conteniendo aproximadamente 25 lts. de agua a una temperatura de 45 °C, se disuelve con agitación constante la cantidad especificada en la fórmula de Sulfato de Neomicina.

**Figura 1. DIAGRAMA DE BLOQUES**  
 Esquemática del proceso de fabricación de la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina B y Gramicidina.



3. Solución C. En el tanque de fabricación se colocan 240 litros de agua de ósmosis inversa, disolviendo enseguida y con agitación constante la cantidad especificada en la fórmula de Isotonizante y Sulfato de Polimixina B.

4. Solución D. En un tanque de acero inoxidable conteniendo aproximadamente 25 litros de agua de ósmosis inversa, se disuelve el sistema amortiguador indicado en la fórmula.

5. Con agitación constante, se incorpora en el tanque de fabricación la solución B, la solución C y el tensoactivo. (Solución E en el diagrama de bloques).

6. A la solución obtenida en el paso anterior (paso 5), se incorpora la solución A obtenida en el paso 1, manteniendo la agitación constante. (solución F del diagrama).

7. El resto de los componentes de la fórmula como son antioxidante, conservador y viscosante, se incorporan en este paso al tanque de fabricación disueltos en agua de ósmosis inversa manteniendo la agitación constante. (solución G del diagrama de bloques).

8. Previa calibración del potenciómetro, se determina el pH de la solución, el cual se encontró en 6.04. Para

la determinación del pH de las soluciones se utilizó un potenciómetro Beckman modelo 50, cuya calibración previa a las determinaciones correspondientes de los pHs, se realizó con soluciones buffer estándar de referencia pH 4.0 y pH 7.0.

9. De la solución obtenida en el paso 7, se separa 1 litro de solución para mantenerla como "solución control". Esta solución se identificó como Solución No. 4.

10. Otro litro de la solución G fué tomada para incorporar el sistema amortiguador No. 1; primero de los tres sistemas a evaluarse. Esta solución se identificó como Solución No. 1.

11. Se tomó un litro más de la solución G para incorporar el segundo sistema amortiguador seleccionado. Esta solución fué identificada como Solución No. 2.

12. Un último litro fué separado del tanque de fabricación (solución G) para incorporar el tercer sistema amortiguador seleccionado para probarse en la solución oftálmica. Esta solución se identificó como Solución No. 3.

13. A la solución G restante se le incorporó finalmente el sistema amortiguador preparado en el paso No. 4, obteniendo un pH final de la solución de 5.70. Un litro de esta solución fué separada para evaluarla respecto de las soluciones 1, 2 y 3. Esta solución fué identificada como Solución No. 5.

Para cada una de las soluciones 1, 2 y 3 el pH final, después de incorporar cada uno de los sistemas amortiguadores, fué de 5.35. Teniendo las soluciones preparadas se procedió entonces a realizar la valoración microbiológica inicial de cada uno de los principios activos: Neomicina, Polimixina B y Gramicidina en el producto de acuerdo a la siguiente metodología.

#### 6.5.2. Valoración microbiológica de Neomicina.

Método de cilindro en placa o Difusión en agar. Este método determina la potencia de los antibióticos comparando la dosis a la cual se inhibe el crecimiento de un microorganismo, adecuado y susceptible, con la dosis de la preparación del antibiótico de referencia en las mismas condiciones de trabajo. (Ver Anexo 1, método general de FEUM).

Medios de cultivo. Medio de cultivo No. 11.

Medio siembra. Medio No. 1.

Microorganismo de prueba. *Staphylococcus aureus* ATCC6538P a una concentración de 25% T, a 580 nm. Incubando a 37°C. Solución diluyente. Solución buffer de fosfatos 0.1 M pH 8.0.

Preparación de la solución estándar. Se pesan 100 mg de Neomicina base estándar de referencia, se disuelve y afora a un volumen de 100 ml con solución buffer de fosfatos pH 8.0. Se toma una parte alícuota de 10 ml y se lleva a un volumen de 100 ml con la solución buffer de fosfatos. De esta solución se toman alícuotas en matraces volumétricos de 50 ml, para la construcción de la curva estándar de referencia: 3.2 ml, 4.0 ml, 5.0 ml, 6.2 ml y 7.8 ml, aforando cada uno de los matraces con solución buffer de fosfatos pH 8.0. Estas soluciones contienen respectivamente 6.4 µg/ml, 8.0 µg/ml, 10.0 µg/ml, 12.5 µg/ml y 15.6 µg/ml de Neomicina.

Preparación de la muestra. Se miden con precisión 15 ml del producto y se colocan en un matraz volumétrico de 25 ml. Llevar a volumen con la solución buffer pH 8.0 y mezclar. Tomar una alícuota de 5 ml de la solución anterior en un matraz volumétrico de 50 ml, aforando con la solución buffer de fosfatos pH 8.0, mezclar. Transferir una alícuota de 5 ml de la solución anterior en un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a volumen con la solución buffer de fosfatos pH 8.0. Esta solución contiene aproximadamente 10 µg/ml de Neomicina.

Procedimiento. La preparación de la prueba se realiza colocando 21 ml de medio antibiótico No. 11 en cada una de las placas como medio base, permitiendo que solidifique el medio. Se añade la capa siembra que contiene medio antibiótico No. 1 y el microorganismo *Staphylococcus aureus*, del cual hay que añadir 4 ml a cada caja. Enseguida se colocan 6 penicilindros de prueba sobre la superficie inoculada a una altura de 12 mm utilizando el colocador de penicilindros, el cual debe asegurar un espacio uniforme en un radio de 2.8 cm (se cubren las placas para evitar contaminación).

Se llenan los 6 penicilindros con las diluciones de la curva de referencia y las muestras para prueba que se hacen por duplicado. Se incuban a 37 °C por 18 a 24 horas.

Los halos de inhibición formados en cada caja se leen en el lector de zonas de inhibición, se grafican los resultados en papel semilogarítmico y sobre la recta obtenida de la solución de referencia, se interpolan los valores de las muestras.

### 6.5.3. Valoración microbiológica de Polimixina B.

Método de cilindro en placa o Difusión en agar. Este método determina la potencia de los antibióticos comparando la dosis a la cual se inhibe el crecimiento

de un microorganismo, adecuado y susceptible, con la dosis de la preparación del antibiótico de referencia en las mismas condiciones de trabajo. (Ver Anexo 1, método general de FEUM).

Medio de cultivo. Medio de cultivo No. 9.

Medio siembra. Medio para antibiótico No. 10.

Microorganismo de prueba. *Bordetella bronchiseptica* ATCC4617 a una concentración de 25% T, a 580 nm. Incubando a 37°C.

Solución diluyente. Solución al 10% de fosfato de potasio pH 6.0.

Preparación de la solución estándar de referencia. Se pesa una cantidad de Sulfato de Polimixina B equivalente a 100,000 U.I. de Polimixina B, transferir a un matraz volumétrico de 10 ml adicionando 2 ml de agua estéril por cada 5 mg del patrón de referencia. Aforar con la solución buffer de fosfatos al 10% pH 6.0. Transferir una alícuota de 2 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 200 ml. Llevar a volumen con la solución buffer de fosfatos al 10%. De esta solución se toman las alícuotas correspondientes para la construcción de la curva de referencia: 3.2 ml, 4.0 ml, 5.0 ml, 6.2 ml, y 7.8 ml, las cuales son colocadas en matraces volumétricos de 50 ml y aforados con solución buffer de fosfatos al 10% pH 6.0. Estas soluciones contienen respectivamente 6.4 U/ml, 8.0 U/ml, 10.0 U/ml, 12.5 U/ml y 15.6 U/ml de Polimixina.

Preparación de la muestra. Tomar una alícuota de 2 ml de la solución problema y colocar en una matraz volumétrico de 100 ml; llevar a volumen con la solución buffer de fosfatos al 10% pH 6.0, mezclar. Transferir una alícuota de 10 ml de la solución anterior en un matraz volumétrico de 100 ml. Aforar con la solución buffer de fosfatos al 10% pH 6.0 y mezclar. Esta solución contiene 10 U/ml de Polimixina B.

Procedimiento. Se colocan 21 ml de medio antibiótico No. 9 en cada una de las placas como medio base, añadiendo 4 ml de la capa siembra que contiene medio antibiótico No. 10 y el microorganismo *Bordetella bronchiseptica*. La colocación de penicilindros y el llenado de los mismos con las soluciones estándar y muestra se realiza de la misma manera que en la valoración de Neomicina.

#### 6.5.4. Valoración microbiológica de Gramicidina.

Método turbidimétrico. Es el método por el cual se mide la turbidez producida por el crecimiento microbiano, a las diferentes concentraciones de antibiótico adicionado, por medio del % Transmitancia en un espectrofotómetro.

Microorganismo de prueba. *Streptococcus faecalis* ATCC10541 con una concentración de 42 % T a 530 nm.

Medio de cultivo. Medio para antibiótico No. 3.

Preparación de la solución estándar. Pesar el equivalente a 10 mg de Gramicidina estándar de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 10 ml. Disolver y aforar con etanol (95%). Transferir 1 ml de esta solución a un matraz de 100 ml, aforar a volumen con etanol y mezclar. Tomar una alícuota de 10 ml de la solución anterior y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml. Aforar con etanol y mezclar. En matraces volumétricos de 100 ml se colocan las alícuotas para preparar la curva estándar de referencia: 2.8 ml, 3.4 ml, 4.0 ml, 4.8 ml y 5.7 ml. Diluir con etanol al 95% y mezclar. Las soluciones contienen 0.028  $\mu\text{g/ml}$ , 0.034  $\mu\text{g/ml}$ , 0.040  $\mu\text{g/ml}$ , 0.048  $\mu\text{g/ml}$  y 0.057  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente de Gramicidina.

Preparación de la muestra. Se toma una alícuota de 2 ml de la solución problema y se coloca en un matraz volumétrico de 50 ml. Se lleva a volumen con etanol y se mezcla. Se transfiere una alícuota de 4 ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 100 ml. Se afora con etanol y se mezcla. Esta solución contiene 0.040  $\mu\text{g/ml}$  de Gramicidina.

Procedimiento. Para la solución estándar se coloca 1 ml de cada dilución en cada uno de tres tubos de prueba preparados. Colocando los tubos triplicados en gradilla

e incluyendo por cada gradilla 1 o 2 tubos de control conteniendo 1 ml de diluyente (etanol).

Después de colocar todas las diluciones de prueba en los tubos, añadir 9.0 ml del inóculo a cada tubo en orden y colocar la gradilla en B.M. a 37 °C. Después de la incubación, añadir 0.5 ml de formaldehído al 12% a cada tubo para inhibir el crecimiento y leer la transmitancia de los tubos de cada gradilla a 530 nm usando como blanco medio de cultivo No. 3.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 Efecto sobre el pH.

De acuerdo con nuestros objetivos establecidos de encontrar un nuevo sistema amortiguador para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina B y Gramicidina, se propusieron y evaluaron 3 diferentes sistemas buffer, los cuales como se mencionó en la preparación de las soluciones (punto 6.5.1), fueron identificadas como *Solución 1*, *Solución 2* y *Solución 3*.

Se trabajó además, con una solución que no contiene sistema amortiguador alguno, a manera de solución de referencia o de control, la cual se identificó como *Solución 4*.

Finalmente una solución que fué preparada que no contiene sistema de acuerdo a la fórmula registrada del producto, es decir, que contiene su propio sistema amortiguador, fué identificada como *Solución 5*, y que era la solución contra la cual se evaluarían los sistemas amortiguadores propuestos.

Los pHs iniciales de cada una de éstas cinco soluciones se presentan en la *Tabla 7.1* y muestran, sobre todo tres hechos importantes: El primero, es que se está considerando el rango de aceptación de pH

oficialmente establecido para la solución, mismo que se encuentra entre 4.7 y 6.0, y por lo tanto, las tres soluciones que contienen los sistemas amortiguadores propuestos se ajustaron en el punto medio de dicha especificación (  $\text{pH} = 5.35$  ); el segundo, que la solución 4 al no contener un sistema amortiguador o buffer, proporciona un pH relativamente alto, el cual se encuentra cercano al límite superior de la especificación ( $\text{pH} = 6.04$ ); el tercero, que el sistema de amortiguamiento que actualmente contiene la fórmula está proporcionando un pH final de la solución por encima del punto medio, y más cercano al límite superior de la especificación ( $\text{pH} = 5.7$ ).

TABLA 7.1. Valores de pH iniciales para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina, ajustada con los sistemas amortiguadores de la TABLA 6.1.

SOLUCION	pH INICIAL
1	5.35
2	5.35
3	5.35
4	6.04
5	5.70

A partir de estos valores y con los pHs obtenidos y tabulados en la Tabla 7.2 se elaboró una gráfica de control, la cual permitiera observar de una mejor manera el comportamiento del pH de las diferentes soluciones con respecto al tiempo. Los resultados

obtenidos y mostrados en la *Tabla 7.2* son el resultado del promedio de tres determinaciones, para cada una de las 5 soluciones en los tiempos mostrados, desde cero hasta 12 meses.

TABLA 7.2. Resultados de pH en función del tiempo para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina, conteniendo 4 diferentes sistemas amortiguadores y una solución "control" (\*)

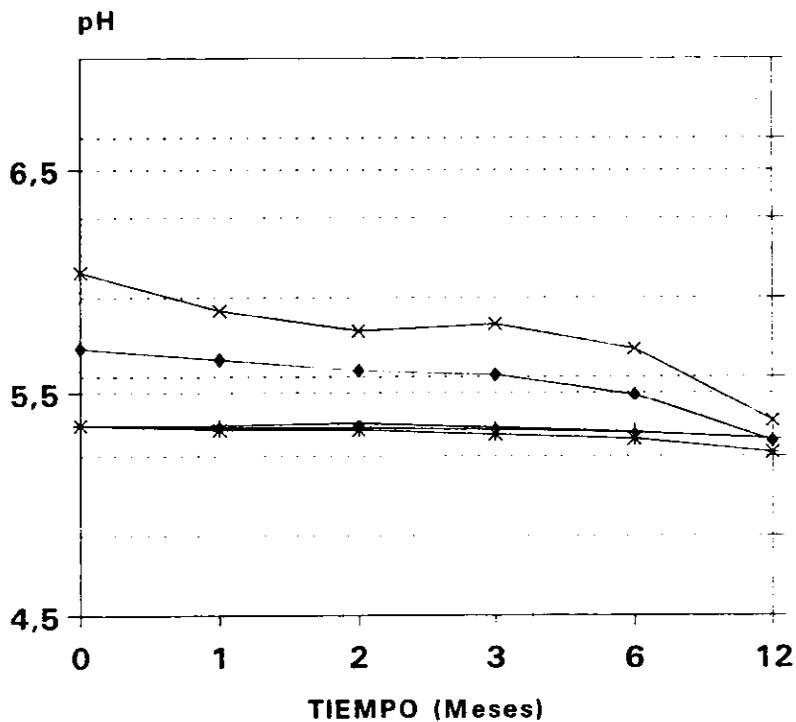
	Inicial	1er. Mes	2do. Mes	3er Mes	6to. Mes	12vo Mes
Solución 1	5.35	5.35	5.36	5.34	5.32	5.29
Solución 2	5.35	5.34	5.34	5.33	5.32	5.29
Solución 3	5.35	5.33	5.33	5.31	5.29	5.23
(*)Solución 4	6.04	5.87	5.78	5.81	5.70	5.37
Solución 5	5.70	5.65	5.60	5.58	5.49	5.28

NOTA: Los resultados de pH que se están presentando son el promedio de tres determinaciones realizadas a cada solución en el tiempo indicado en la tabla.

Estos promedios de la *Tabla 7.2* son los que se graficaron respecto al tiempo, y la *figura 1* (*Gráfica de Control*) muestra este comportamiento, donde se puede observar como las 3 soluciones que contienen los sistemas amortiguadores propuestos (*Solución 1*, *Solución 2* y *Solución 3*), son capaces de mantener la solución con variaciones de pH menores a los que presenta la misma solución con el sistema amortiguador de la fórmula (*Solución 5*). Esta última solución presenta una pendiente negativa muy similar a la de la *Solución 4*, a la cual no se incorporó ningún sistema amortiguador.

En términos de valores, mientras las soluciones 1 y 2 solo permitieron una variación o disminución del pH en 0.06 unidades, la Solución 3 lo hizo en 0.12 unidades, y la Solución 5 por su parte lo hizo en 0.42 unidades. Cabe resaltar el hecho que el comportamiento de la Solución 5 tiene cierta similitud, como ya lo mencionamos, con el comportamiento de la Solución 4 de control, donde la variación fué de 0.67 unidades de pH.

**Fig. 1. GRAFICA DE CONTROL. Resultados de pH en las 5 diferentes soluciones como función del tiempo.**



— Solución 1 + Solución 2 \* Solución 3

\* Solución 4 ◆ Solución 5

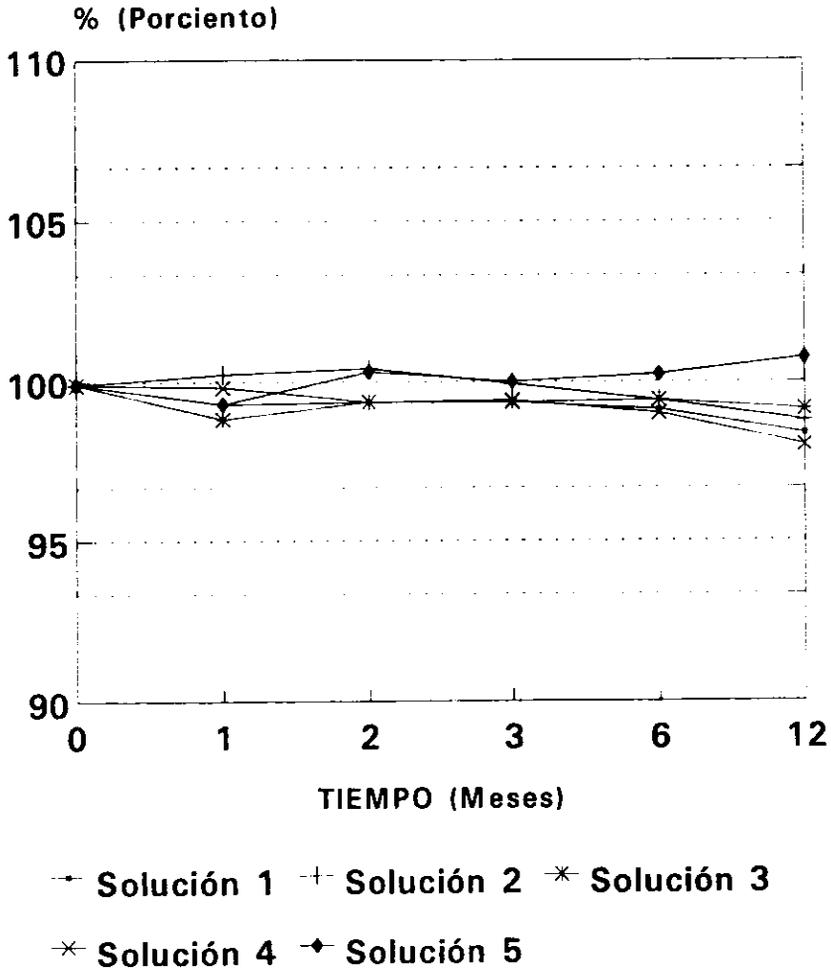
" Solución oftálmica de Neomicina,  
Polimixina y Gramicidina ".

## 7.2 Efecto sobre la valoración.

De la misma manera en que se monitoreó el comportamiento del pH con el transcurso del tiempo, se elaboraron gráficas de control para los resultados obtenidos de la valoración para cada uno de los tres activos que componen la fórmula (Neomicina, Polimixina B y Gramicidina). En la figura 2 se presentan las valoraciones correspondientes a la Neomicina junto con su gráfica de control, en la cual se puede observar que las soluciones 1, 2, 3 y 4 presentan un comportamiento relativamente "normal" al disminuir su valoración entre 1% y 2%, sin embargo, en la Solución 5 se observa una ligera tendencia a mantenerse o incrementarse esta valoración.

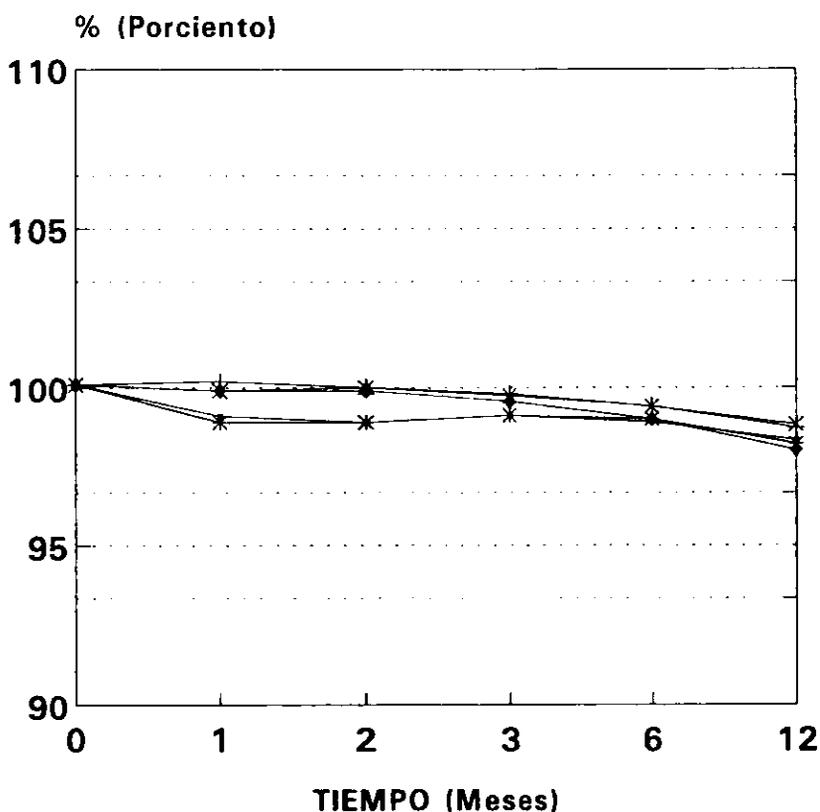
La figura 3 presenta la gráfica de control para la Polimixina B, y en ella se puede ver que el comportamiento general en las diferentes soluciones es uniforme y con una evidente tendencia a la disminución conforme transcurre el tiempo, aunque ésta se puede considerar aceptable teniendo en consideración que la máxima disminución la está presentando la Solución 5 con un 2.1%. Cabe resaltar el comportamiento muy similar entre las soluciones 2 y 4, las cuales presentan los menores porcentajes de disminución en la valoración del antibiótico (1.38% y 1.28% respectivamente).

**Fig. 2. GRAFICA DE CONTROL. Resultados en % para la valoración de Neomicina en las 5 diferentes soluciones de prueba.**



**" Solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina".**

**Fig. 3. GRAFICA DE CONTROL. Resultados en % para la valoración de Polimixina B en las 5 diferentes soluciones.**



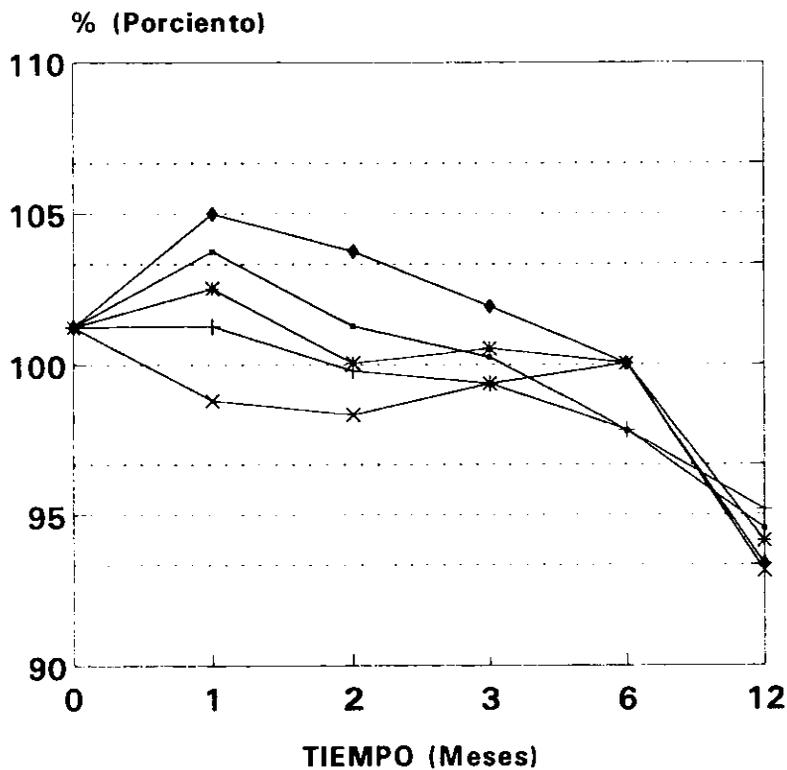
—•— Solución 1    -+- Solución 2    \* Solución 3

—x— Solución 4    —♦— Solución 5

" Solución oftálmica de Neomicina,  
Polimixina y Gramicidina ".

Finalmente la Gramicidina, tercer componente activo de la fórmula, fué quien presentó el mayor porcentaje de disminución en la valoración como lo muestra la figura 4, donde además se puede observar que el menor porcentaje de disminución corresponde a la Solución 2 con un 6.08%, en tanto la Solución 4 fué la que presentó la mayor disminución con 8.11%.

**Fig. 4. GRAFICA DE CONTROL. Resultados de valoración para la Gramicidina en % para las 5 diferentes soluciones.**



— Solución 1    + Solución 2    \* Solución 3  
 x Solución 4    ◆ Solución 5

" Solución oftálmica de Neomicina,  
 Polimixina y Gramicidina ".

### 7.3 Análisis estadístico.

Para tratar de establecer o determinar con una mejor precisión el sistema amortiguador más adecuado para la solución oftálmica de "Neomicina, Polimixina y Gramicidina", se decidió realizar un Análisis de Varianza para los resultados obtenidos de pH en las 5 soluciones y las Valoraciones de cada uno de los tres antibióticos respecto al tiempo.

En la *Tabla 7.3* se encuentran tabulados los valores de pH obtenidos en las 5 diferentes soluciones durante los doce meses que se realizó el estudio, en la cual se presentan además las sumas totales, tanto de las columnas que representan el tiempo, como de las filas que representan las soluciones problema. Las *Tablas 7.4, 7.5* y *7.6* muestran los resultados de las valoraciones de los tres activos de la fórmula que son: Neomicina, Polimixina B y Gramicidina respectivamente. De la misma forma en que se presentan los resultados en la *Tabla 7.3* para pH, estas tablas incluyen las sumas totales tanto de las columnas como de las filas (que también representan tiempo y solución respectivamente), que son necesarios para realizar el Análisis de Varianza mencionado que, como es sabido, es un procedimiento general de prueba que supone normalidad en la población.

TABLA 7.3. Resultados de pH para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina, conteniendo 4 diferentes sistemas amortiguadores y una solución "control"(\*), respecto al tiempo. Identificadas como Filas y Columnas para el análisis estadístico. Incluye promedios y sumas totales de estos.

FILAS	COLUMNAS						Totales	Promedios
	inicial	1er Mes	2do Mes	3er Mes	6to Mes	12vo Mes		
Solución 1	5.35	5.35	5.36	5.34	5.32	5.29	32.01	5.335
Solución 2	5.35	5.34	5.34	5.33	5.32	5.29	31.97	5.328
Solución 3	5.35	5.33	5.33	5.31	5.29	5.23	31.84	5.307
(*) Solución 4	6.04	5.87	5.78	5.81	5.70	5.37	34.57	5.761
Solución 5	5.70	5.65	5.60	5.58	5.49	5.28	33.30	5.550
Totales	27.79	27.54	27.41	27.37	27.12	26.46	163.69	
Promedios	5.558	5.508	5.482	5.474	5.424	5.292		

(\*) solución control, la cual no contiene sistema amortiguador.

TABLA 7.4. Resultados de valoración para la Neomicina, en mg/ml, como función del tiempo para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina, en las soluciones de prueba 1,2,3 y 5, y la solución "control"(\*)4. Incluye promedios y sumas totales para las columnas y filas.

FILAS	COLUMNAS					Totales	Promedios
	1er Mes	2do Mes	3er Mes	6to Mes	12vo Mes		
Solución 1	1.733	1.734	1.734	1.730	1.717	8.648	1.7296
Solución 2	1.75	1.752	1.7438	1.735	1.724	8.705	1.7409
Solución 3	1.725	1.734	1.734	1.735	1.730	8.658	1.731
(*) Solución 4	1.742	1.734	1.735	1.728	1.710	8.649	1.729
Solución 5	1.733	1.750	1.745	1.749	1.757	8.735	1.747
Totales	8.683	8.704	8.691	8.677	8.639	43.3954	
Promedios	1.736	1.740	1.738	1.735	1.727		

(\*) solución control, la cual no contiene sistema amortiguador.

TABLA 7.5. Resultados de valoración, en U.I./ml, para Polimixina B en la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina, que contiene 4 diferentes sistemas amortiguadores y una solución "control"(\*), respecto al tiempo. Identificadas como Filas y Columnas para el análisis estadístico. Incluye promedios y sumas totales de estos.

FILAS	COLUMNAS					Totales	Promedios
	1er Mes	2do Mes	3er Mes	6to Mes	12vo Mes		
Solución 1	4.960	4.950	4.961	4.950	4.922	24.743	4.9486
Solución 2	5.015	5.005	4.995	4.975	4.941	24.931	4.9862
Solución 3	4.950	4.950	4.961	4.955	4.915	24.731	4.9462
(*) Solución 4	5.000	5.005	4.992	4.975	4.946	24.918	4.9836
Solución 5	5.000	5.000	4.983	4.955	4.905	24.843	4.9686
Totales	24.925	24.910	24.892	24.810	24.629	124.166	
Promedios	4.985	4.982	4.978	4.962	4.925		

(\*) solución control, la cual no contiene sistema amortiguador.

TABLA 7.6. Resultados de valoración para la Gramicidina, en mg/ml para las 4 soluciones de prueba y una solución "control"(\*), en la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina. Incluye promedios y sumas totales para las filas y columnas.

FILAS	COLUMNAS					Totales	Promedios
	1er Mes	2do Mes	3er Mes	6to Mes	12vo Mes		
Solución 1	0.0262	0.0256	0.0253	0.0247	0.0239	0.1258	0.0251
Solución 2	0.0256	0.0252	0.0251	0.0247	0.0240	0.1248	0.0249
Solución 3	0.0259	0.0253	0.0254	0.0253	0.0238	0.1258	0.0251
(*) Solución 4	0.0250	0.0248	0.0251	0.0253	0.0235	0.1238	0.0247
Solución 5	0.0265	0.0262	0.0257	0.0253	0.0236	0.1275	0.0255
Totales	0.1293	0.1273	0.1268	0.1254	0.1189	0.62798	
Promedios	0.0258	0.0254	0.0253	0.0250	0.0237		

(\*) solución control, la cual no contiene sistema amortiguador.

En la Tabla 7.7 se presenta el Cuadro de Análisis de Varianza para los resultados obtenidos; tanto de comportamiento de pH en función del tiempo, como de la Valoración de cada uno de los tres principios activos, también en función del tiempo.

Este cuadro muestra la manera en que serán presentados los resultados de éste análisis de varianza, así como las fórmulas que se utilizaron para la realización del mismo. El Planteamiento de la hipótesis para la realización del análisis fué el siguiente:

Hipótesis nula

$$H_0 : \mu = \mu_i$$

Hipótesis alternativa

$$H_1 : \mu \neq \mu_i$$

Trabajando con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

La regla de decisión para el Análisis fué:

1. Se acepta  $H_0$  si  $F_c \leq F_{tab}$

2. Se rechaza  $H_0$  si  $F_c > F_{tab}$

Como parte final de los resultados, las tablas 7.8, 7.9, 7.10 y 7.11 muestran los cuadros de Análisis de Varianza para cada uno de los tratamientos realizados; junto con las tablas se realiza su análisis, discusión y decisión correspondiente a cada uno de ellos.

TABLA 7.7. Cuadro de análisis de varianza ( ANADEVVA ), incluyendo fórmulas utilizadas para el análisis de los resultados.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Filas (B)	(r - 1)	SCB	CMB [SCB/(r - 1)]	$\frac{CMB}{CME}$
Columnas (C)	(c - 1)	SCC	CMC [SCC/(c - 1)]	$\frac{CMC}{CME}$
Error experimental	(c - 1) (r - 1)	SCE	CME [SCE/(c - 1) (r - 1)]	
Total	cr - 1	SCT		

$$F.C. = \frac{1}{r \cdot c} t^2 \dots\dots\dots \text{FACTOR DE CORRECCION}$$

$$SCT = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c y^2_{ij} - C \dots\dots\dots \text{SUMA DE CUADRADOS TOTAL}$$

$$SCB = \frac{1}{c} \sum_{i=1}^r t^2_{i.} - C \dots\dots\dots \text{SUMA DE CUADRADOS DE LOS BLOQUES}$$

$$SCC = \frac{1}{r} \sum_{j=1}^c t^2_{.j} - C \dots\dots \text{SUMA DE CUADRADOS DE LAS COLUMNAS}$$

$$SCE = SCT - (SCB + SCC) \dots \text{SUMA DE CUADRADOS DEL ERROR EXPERIMENTAL}$$

TABLA 7.8. Cuadro de análisis de varianza ( ANADEVVA ), para el efecto de la solución y el tiempo sobre el pH en la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Solución	4	0.93305	0.2332625	28.08
Tiempo	5	0.21014	0.042028	5.06
Error experimental	20	0.16611	0.008305	
Total	29	1.3093		

1. Para el tratamiento de las filas existe una influencia significativa sobre el pH por parte del tipo de solución, ya que:  $F_c > F_t$ , es decir,  $28.08 > 2.87$ , por lo tanto se rechaza  $H_0$  con 4,20 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

2. Para el tratamiento de las columnas también existe una influencia significativa del tiempo sobre el pH ya que:  $F_c > F_t$ , es decir  $5.06 > 2.71$ , por lo tanto se rechaza  $H_0$  con 5,20 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

TABLA 7.9. Cuadro de análisis de varianza ( ANADEVVA ), para el efecto de la solución y el tiempo sobre la valoración de la Neomicina.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Solución	4	0.00121	0.0003025	3.872
Tiempo	4	0.00049	0.0001225	1.568
Error experimental	16	0.00125	0.0000781	
Total	24	0.00295		

1. Para el tratamiento de las filas existe una influencia significativa por parte del tipo de solución sobre la valoración de la Neomicina, ya que:  $F_c > F_t$ , es decir,  $3.872 > 3.01$ , por lo tanto se rechaza  $H_0$  con 4,16 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

2. Para el tratamiento de las columnas no existe una influencia significativa del tiempo sobre la valoración de la Neomicina ya que:  $F_c < F_t$ , es decir,  $1.568 < 3.01$ , por lo tanto se acepta  $H_0$  con 4,16 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

TABLA 7.10. Cuadro de análisis de varianza ( ANADEVVA ), para el efecto de la solución y el tiempo sobre la valoración de la Polimixina B.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Solución	4	0.007038	0.0017595	11.31
Tiempo	4	0.011978	0.0029945	19.257
Error experimental	16	0.002488	0.0001555	
Total	24	0.021504		

1. Para el tratamiento de las filas existe una influencia significativa por parte del tipo de solución sobre la valoración de la Polimixina B, ya que:  $F_c > F_t$ , es decir,  $11.31 > 3.01$ , por lo tanto se rechaza  $H_0$  con 4,16 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

2. Para el tratamiento de las columnas también existe una influencia significativa del tiempo sobre la valoración de la Polimixina B ya que:  $F_c > F_t$ , es decir  $19.257 > 3.01$ , por lo tanto se rechaza  $H_0$  con 4,16 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

TABLA 7.11. Cuadro de análisis de varianza ( ANADEVVA ), para el efecto de la solución y el tiempo sobre la valoración de Gramicidina.

FUENTE DE VARIACION	G.L.	S.C.	C.M.	F
Solución	4	$1.05 \times 10^{-6}$	$2.62 \times 10^{-7}$	1.82
Tiempo	4	$1.25 \times 10^{-5}$	$3.132 \times 10^{-6}$	21.91
Error experimental	16	$2.302 \times 10^{-6}$	$1.43 \times 10^{-7}$	
Total	24	$1.588 \times 10^{-5}$		

1. Para el tratamiento de las filas no existe una influencia significativa por parte del tipo de solución sobre la valoración de la Gramicidina, ya que:  $F_c < F_t$ , es decir,  $1.82 < 3.01$ , por lo tanto se acepta  $H_0$  con 4,16 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

2. Para el tratamiento de las columnas existe una influencia significativa del tiempo sobre la valoración de la Gramicidina ya que:  $F_c > F_t$ , es decir  $21.91 > 3.01$ , por lo tanto, se rechaza  $H_0$  con 4,16 grados de libertad y un  $\alpha = 0.05$ .

## 8. CONCLUSIONES

1. Los 3 sistemas propuestos para la solución oftálmica de Neomicina, Polimixina y Gramicidina, producen el efecto de amortiguamiento esperado, ya que las variaciones producidas por estos sistemas en 12 meses son menores a 0.12 unidades de pH en comparación con las 0.42 unidades de pH que presentó como variación la Solución 5. Esto se hace más evidente cuando se analiza la gráfica de control donde la pendiente de esta solución 5 se presenta como la más negativa de las cuatro soluciones que contienen un sistema amortiguador.

2. La valoración de los activos en la solución sólo se afecta en un bajo porcentaje en la Gramicidina, no así la Neomicina y Polimixina B en las cuales no se observa efecto alguno. Sin embargo, la prueba de hipótesis nos confirma el hecho de que la valoración solamente varía debido a la influencia del tiempo y no por efecto de la solución.

3. Los sistemas propuestos 1 y 2, de acuerdo con nuestra experiencia, podrían ser los mejores amortiguadores para la solución oftálmica. Los resultados obtenidos no nos permiten confirmar esto, por lo tanto, proponemos la realización de un estudio completo de estabilidad para confirmarlo.

## 9. ANEXO 1

### POTENCIA MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS.

Para determinar la potencia microbiológica de los antibióticos se emplean dos métodos generales:

- a) Difusión en agar
- b) Turbidimétrico

Estos métodos comparan la respuesta de un microorganismo específico y sensible frente a un estándar de actividad conocida y una muestra, bajo condiciones idénticas de ensayo.

#### METODO DE DIFUSION EN AGAR.

Se basa en la difusión del antibiótico desde un punto de aplicación, a través de una superficie de agar inoculado con el microorganismo de prueba. La difusión origina zonas de inhibición del microorganismo, cuyo tamaño (diámetro) está en relación con la concentración del antibiótico.

#### METODO TURBIDIMETRICO.

Este método se efectúa en un medio de cultivo líquido inoculado con el microorganismo de prueba, al que se le agregan concentraciones crecientes del antibiótico. Después del periodo de incubación, se determina la turbiedad producida por el crecimiento microbiano, el cual está en función de la concentración del antibiótico.

#### MATERIAL.

Todo el material debe estar limpio y perfectamente enjuagado con agua destilada para eliminar cualquier residuo que pueda afectar el crecimiento del microorganismo de prueba. El material de vidrio para el mantenimiento, manejo, transferencia y desarrollo de los microorganismos, debe esterilizarse por calor seco a 170°C - 180°C durante 1 hora.

**MEDIOS DE CULTIVO.**

Siempre que sea posible emplear medios de cultivo comerciales, prepararlos, respetando estrictamente las indicaciones del fabricante o bien a partir de sus ingredientes.

Determinar el pH del medio y ajustar, si es necesario, con soluciones 0.5 M de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio según se requiera.

Probar la capacidad del medio de cultivo para:

1. Promover el crecimiento del microorganismo de prueba.
2. Permitir la difusión del antibiótico que origine zonas de inhibición bien definidas y medibles.

**Medio número 1**

Peptona	6.0 g
Digerido pancreático de caseína	4.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de carne	1.5 g
Dextrosa	1.0 g
Agar	15.0 g
Agua c.b.p.	1000 ml
pH después de la esterilización	6.5 ± 0.1

**Medio número 3**

Peptona	5.0 g
Extracto de levadura	1.5 g
Extracto de carne	1.5 g
Cloruro de sodio	3.5 g
Dextrosa	1.0 g
Fosf. dib. potasio	3.68g
Fosf. mon. potasio	1.32g
Agua c.b.p.	1000 ml
pH después de la esterilización	7.0 ± 0.05

**Medio número 2**

Peptona	6.0 g
Extracto de levadura	3.0 g
Extracto de carne	1.5 g
Agar	15.0 g
Agua c.b.p.	1000 ml
pH después de la esterilización	6.5 ± 0.1

**Medio número 5**

Es el medio número 2 excepto que el pH después de la esterilización es 7.8 ± 0.2.

**Medio número 8**

Es el medio número 2 excepto que el pH después de la esterilización es 5.9 ± 0.1.

**Medio número 9**

Digerido pancreático  
de caseína 17.0g  
Digerido papainico  
de soya 3.0 g  
Cloruro de sodio 5.0 g  
Fosfato dipotásico 2.5 g  
Dextrosa 2.5 g  
Agar 20.0g  
Agua c.b.p. 1000 ml  
pH después de la  
esterilización 7.3 ± 0.1

**Medio número 10**

Es el medio número 9 excepto  
que este medio contiene 12 g  
de agar y 1% de polisorbato  
80. (Si el medio se prepara  
a partir de ingredientes,  
agregar el polisorbato des-  
agar  
pués de hervir el medio para  
disolver el agar).

**Medio número 11**

Es el medio número 1 excepto  
que el pH después de la este-  
rilización es 7.8 ± 0.2.

**Medio número 19**

Peptona 9.4 g  
Extracto de levadura 4.7 g  
Extracto de carne 2.4 g  
Cloruro de sodio 10.0g  
Dextrosa 10.0g  
Agar 23.5g  
Agua c.b.p. 1000 ml  
pH después de la  
esterilización 6.1 ± 0.1

**Medio número 32**

Preparar el medio como indica  
medio número 1, excepto que  
se agregan 300 mg de  $MnSO_4 \cdot H_2O$   
(Sulfato de Manganeso monohi-  
dratado) a cada litro de  
medio.

**Medio número 34**

Glicerol 10.0g  
Peptona 10.0g  
Extracto de carne 10.0g  
Cloruro de sodio 3.0 g  
Agua c.b.p. 1000 ml  
pH después de la  
esterilización 7.0 ± 0.1

**Medio número 35**

Es el medio número 34 excepto  
que se agregan 17.0 g de  
a cada litro de medio.

**Medio número 36**

Digerido pancreático  
de caseína 15.0g  
Digerido papainico  
de soya 5.0 g  
Cloruro de sodio 5.0 g  
Agar 15.0g  
Agua c.b.p. 1000 ml  
pH después de la  
esterilización 7.3 ± 0.1

## SOLUCIONES REGULADORAS.

Preparar las soluciones con agua destilada estéril, determinar el pH, si es necesario ajustarlo con soluciones 18 N de ácido fosfórico o 10 N de hidróxido de potasio, según lo requiera.

Solución número 1. Fosfato de potasio al 1%, pH 6.0.

Fosfato dibásico de potasio	2.0 g
Fosfato monobásico de potasio	8.0 g
Agua c.b.p.	1000 ml
pH	6.0 $\pm$ 0.05

Solución número 3. Fosfato de potasio 0.1 M, pH 8.0.

Fosfato dibásico de potasio	16.73 g
Fosfato monobásico de potasio	0.523 g
Agua c.b.p.	1000 ml
pH	8.0 $\pm$ 0.1

Solución número 6. Fosfato de potasio al 10%, pH 6.0.

Fosfato dibásico de potasio	20.0 g
Fosfato monobásico de potasio	80.0 g
Agua c.b.p.	1000 ml
pH	6.0 $\pm$ 0.05

Solución número 10. Fosfato de potasio 0.2 M, pH 10.5.

Fosfato dibásico de potasio	35.0 g
Hidróxido de potasio 10 N	2.0 ml
Agua c.b.p.	1000 ml
pH	10.5 $\pm$ 0.1

Solución número 16. Fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.0.

Fosfato dibásico de potasio	13.6 g
Fosfato monobásico de potasio	4.0 g
Agua c.b.p.	1000 ml
pH	7.0 $\pm$ 0.2

#### *SUSTANCIAS DE REFERENCIA (SRef).*

Son preparaciones de antibióticos que tienen actividad conocida expresada en unidades o microgramos por miligramo del material seco. La actividad de un patrón primario de un antibiótico la establecen las agrupaciones oficiales nacionales o internacionales. En los ensayos de rutina es recomendable usar patrones de trabajo cuya actividad se determina frente a un patrón primario, con un mínimo de 6 ensayos realizados con diferentes pesadas durante 2 o más días.

#### *MÉTODOS DE SECADO.*

##### *Método número 1*

En una atmósfera con 10% de humedad relativa, pesar 100 mg de SRef en un pesafiltro. Colocarlo sin tapar en una estufa de vacío, secar a 60°C durante 5 horas y a una presión de 5 mm de Hg o menor. Al final de este periodo, llenar la estufa con aire desecado a través de ácido sulfúrico o gel de sílice. Abrir la estufa, tapar el pesafiltro inmediatamente y colocarlo en un desecador que contenga el agente desecante.

##### *Método número 3.*

Proceder como en el método número 1, excepto que se deberá secar la SRef durante 3 horas a 110°C a una presión de 5 mm de Hg o menor.

##### *Método número 4.*

Proceder como en el método número 1, excepto que se deberá secar la SRef durante 2 horas a 40°C a una presión de 5 mm de Hg o menor.

Método número 7.

Proceder como en el método número 1, excepto que se deberá secar la SRef durante 4 horas a 25°C a una presión de 5 mm de Hg o menor.

#### MÉTODOS DE PREPARACION DE LA SUSPENSION DE LOS MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

En la Tabla número 2 se señalan las condiciones para preparar y conservar las suspensiones de los microorganismos de prueba.

Método número 1.

Preparación de la suspensión. De acuerdo con la Tabla número 2, sembrar el microorganismo de prueba en tubos con el medio de cultivo preparado en posición inclinada. Incubar a 32°C-35°C durante 24 horas. Cosechar el crecimiento con 3 ml de solución salina estéril. Inocular con esta suspensión 5 tubos de 22 x 200 mm, que contienen aproximadamente 15 ml de medio de cultivo inclinado o en una botella de Roux con 250 ml de medio de cultivo. Incubar a 32°C-35°C durante el periodo indicado para cada microorganismo. Transcurrido el periodo de incubación, cosechar el crecimiento de cada tubo con aproximadamente 4.0 ml de solución salina o con 50 ml para botellas de Roux (este volumen depende de la cantidad de crecimiento).

Ajuste de la suspensión. Determinar en la suspensión original la dilución que permita obtener en un fotocolorímetro y a una longitud de onda de 580 nm, un 25% de transmitancia  $\pm$  2%. La dilución sólo sirve de referencia para el ajuste de la suspensión original con la cual se debe inocular el medio para capa de siembra. En cada caso tomar como base el inóculo sugerido en la Tabla No. 2.

Determinar el volumen de suspensión original que debe agregarse al medio para capa de siembra, para obtener zonas de inhibición bien definidas y medibles, o una respuesta (turbiedad) proporcional a la concentración del antibiótico en el caso del método turbidimétrico. Conservar la suspensión original en refrigeración.

#### Método número 2.

Proceder como se indica en el método número 1, excepto que se deberán inocular 3 ml de la suspensión del microorganismo de prueba en un botella de Roux que contiene 250 ml del medio de cultivo señalado. Incubar a la temperatura y tiempo indicados en la Tabla No. 2. Recuperar el crecimiento con 50 ml de solución salina, centrifugar y decantar el sobrenadante. Resuspender con 50 a 70 ml de solución salina y calentar la suspensión a 70°C durante 30 minutos. Efectuar pruebas para determinar la cantidad de inóculo (esporas) que debe agregarse a cada 100 ml de medio para capa de siembra, para obtener halos de inhibición bien definidos y medibles. Conservar la suspensión en refrigeración.

#### Método número 5.

Mantener el microorganismo de prueba en 100 ml del medio de cultivo número 3. Para el ensayo, preparar un cultivo reciente, transferir una asada de este cultivo al mismo medio; incubar a 37°C durante 16 a 18 horas. Conservar el cultivo en refrigeración.

#### Método número 7.

Proceder como se indica en el método número 1, excepto que los tubos se incuban a 30°C durante 24 horas y las botellas de Roux a 30°C durante 48 horas.

#### Método número 8.

Resembrar el microorganismo de prueba en el medio de cultivo indicado en la tabla 2, incubar a 37°C durante 48 horas, recuperar el crecimiento con 3 ml de solución salina estéril y pasarlos a un matraz Erlenmeyer de 500 ml, que contiene 100 ml de medio número 34 y aproximadamente 50 g de perlas de vidrio. Incubar en agitación por rotación (a 130 rpm en un radio de 3.5 cm) a 27°C durante 5 días. Determinar la cantidad de suspensión que debe añadirse a cada 100 ml del medio para capa de siembra. Conservar la suspensión en refrigeración.

## PROCEDIMIENTO.

### PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO DE LA SRef.

En las tablas No. 4 y No. 6 aparecen para cada antibiótico las condiciones de secado de la SRef, los solventes, los diluyentes, las concentraciones a las que se debe de llegar en cada uno de ellos, así como el periodo de almacenamiento en refrigeración de las soluciones de trabajo.

Desechar la SRef, si es necesario, y de acuerdo con el método indicado en las tablas No. 4 y No. 6. Pesar una cantidad exacta para obtener la concentración requerida en el solvente o diluyente señalado. Almacenar la solución de trabajo de la SRef en refrigeración y no usarla por periodos mayores a los recomendados. Diluir la solución de trabajo de la SRef en el diluyente especificado para obtener las concentraciones de la línea dosis respuesta.

Preparación de la muestra. En base a la potencia teórica de la muestra, preparar la dilución de prueba (concentración media de la línea dosis respuesta) que se especifica para cada antibiótico.

### *Método de difusión en agar.*

Preparación de las placas. Para cada antibiótico enlistado en la tabla No. 3, seleccionar los medios de cultivo, el microorganismo de prueba e inóculo sugerido (véase tabla No. 2).

En cada ensayo preparar 12 placas para la línea dosis respuesta, y tres para cada muestra.

Distribuir sobre una superficie plana y a nivel, la cantidad señalada del medio de cultivo para capa base (estéril, fundido y mantenido a 50°C aproximadamente). Dejar las tapas de las cajas entreabiertas para evitar la acumulación de agua de condensación. Permitir que el agar solidifique y tapar.

Preparar el volumen necesario del medio de cultivo para capa de siembra, considerando el número de cajas para la prueba.

Inocular el medio de cultivo para capa de siembra (estéril, fundido y mantenido a 48°C-50°C), con la cantidad sugerida de la suspensión de microorganismos. Agregar a cada caja conteniendo la capa base solidificada, el volumen de capa de siembra indicado, extender uniformemente y dejar solidificar en las cajas así preparadas. Colocar 6 cilindros de acero inoxidable a intervalos regulares de 60° sobre un radio de 2.8 cm.

Para la curva de referencia utilizar un total de 12 placas, tres para cada una de las soluciones de la curva, excepto para la concentración central o punto de referencia de la curva; ésta se incluye en todas las placas. En cada conjunto de tres placas, llenar tres cilindros con la concentración media de referencia y alternar 3 cilindros con la concentración más baja de la curva, y así sucesivamente con cada concentración de referencia. De esta manera se tendrán 36 zonas de inhibición para la concentración de la SRef y 9 zonas de inhibición para cada una de las otras cuatro concentraciones de la curva (a, b, d, e).

Para cada muestra se emplean 3 placas, en las que se llenan 3 cilindros de cada una de ellas con la concentración media de referencia y 3 con la solución de la muestra preparada a la misma concentración. Incubar las placas durante 16 a 18 horas y a la temperatura indicada para cada antibiótico en la tabla No. 3. Después del período de incubación medir el diámetro de las zonas de inhibición.

Preparación de la línea dosis-respuesta. Promediar las zonas de inhibición de cada una de las concentraciones de la SRef de los 4 conjuntos de 3 placas. El promedio de las 36 lecturas de la concentración media de la SRef (punto c) corresponde al punto de corrección de la curva con el cual se corrigen los promedios de cada una de las concentraciones de la SRef (puntos a, b, d, e).

La corrección se efectúa de la siguiente manera: si el promedio de las 36 lecturas de la SRef (punto c) es mayor al valor promedio de las lecturas del punto "c" en cualquiera de las concentraciones de la curva, la diferencia se suma; si por el contrario el promedio de la SRef de 36 lecturas es menor, la diferencia se resta para así corregir el valor de ese punto.

Con los valores corregidos trazar la línea dosis-respuesta a través de todos los puntos o bien utilizando los valores del punto más alto (H) y del más bajo (L), calculados mediante la siguiente fórmula:

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5 \quad \text{y} \quad H = (3c + 2d + c - a) / 5$$

en donde L es el diámetro de la zona de inhibición en milímetros para la concentración más baja de la SRef; H es el diámetro calculado de la zona de inhibición en milímetros para la concentración más alta de la SRef; a, b, c, d, e, son los promedios de los valores corregidos para las concentraciones de la SRef.

Estimación de la potencia de la muestra. Promediar los diámetros de las zonas de inhibición de la SRef y de la muestra en las tres placas empleadas. Si el promedio del diámetro de las zonas de inhibición de la muestra es mayor que el de la SRef, sumar la diferencia entre ellos al diámetro de la concentración media de referencia de la línea dosis-respuesta de la curva estándar. Si el promedio del diámetro de las zonas de inhibición de la muestra es más baja que la de la SRef, restar la diferencia entre ellos al diámetro de la concentración media de la línea dosis-respuesta. Interpolar en la línea dosis-respuesta el valor corregido para obtener la concentración correspondiente y multiplicarla por el factor de dilución para determinar el contenido de antibiótico de la muestra.

#### METODO TURBIDIMETRICO.

Para cada antibiótico enlistado en la tabla No. 6, seleccionar el microorganismo de prueba (ver tabla No. 2), medio de cultivo e inóculo sugerido y proceder como sigue:

Emplear 15 tubos para los 5 puntos de la línea dosis-respuesta y 3 para cada muestra.

Colocar 1.0 ml (o 0.1 ml en el caso de Gramicidina) de cada concentración de la SRef y de la muestra a la concentración media en cada conjunto de 3 tubos. Agregar a cada tubo 9 ml del medio de cultivo inoculado e incubar de 2 horas a 4 horas en un Baño María (BM) a la temperatura indicada para cada antibiótico. El tiempo de incubación puede determinarse observando el desarrollo en la concentración media de la SRef; el punto final del ensayo es cuando los tubos conteniendo la concentración media de la SRef proporcionen lecturas aproximadas del 50% de transmitancia aproximadamente.

Retirar los tubos del BM y detener el desarrollo inmediatamente, agregando a cada tubo 0.5 ml de una solución de formaldehído al 12%. Determinar el valor de transmitancia para cada tubo en un fotómetro a una longitud de onda de 530 nm.

Ajustar el instrumento a 100% de transmitancia con un blanco del medio del cultivo sin inocular y 0.5 ml de formaldehído al 12%.

Trazar la línea dosis-respuesta en papel semilogarítmico de un ciclo, colocando los valores de la concentración en la escala aritmética.

La línea dosis-respuesta se traza a través de todos los puntos, o bien utilizando los valores alto (H) y bajo (L) obtenidos mediante las siguientes fórmulas:

$$L = (3a + 2b + c - e) / 5 \quad \text{y} \quad H = (3e + 2d + c - a) / 5$$

en donde  $L$  es el valor de transmitancia calculado para la concentración más baja de la  $S_{Ref}$ ;  $H$  es el valor de transmitancia calculado para la concentración más alta de la  $S_{Ref}$ ;  $a, b, c, d, e$ , son los promedios de los valores de transmitancia para cada concentración de la  $S_{Ref}$ , del más bajo al más alto respectivamente.

#### ESTIMACION DE LA POTENCIA DE LA MUESTRA.

Promediar los valores de transmitancia para la muestra y determinar la concentración interpolando en la línea dosis-respuesta. Multiplicar la concentración obtenida por el factor de dilución para encontrar el contenido del antibiótico en la muestra.

**TABLA 2**

Microorganismo de prueba	Método	Medio Utilizado		Período de Factor de	Período de almacenamiento Incubación	dilución sugiendo en refrigeración
		Mantenimiento	Suspensión De prueba			
A) <i>Staphylococcus aureus</i> (6538P o 2977)	1	1	1	24	1:20	1 semana
C) <i>Micrococcus luteus</i> (9341)	1	1	1	24	1:40	2 semanas
D) <i>Staphylococcus epidermis</i> (12228)	1	1	1	24	1:14	1 semana
E) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (9763)	7	19	19	48	1:30	4 semanas
F) <i>Bordetella bronchiseptica</i> (4617)	1	1	1	24	1:20	2 semanas
H) <i>Bacillus subtilis</i> (6633)	1	1	1	24	(*)	6 meses
	2	1	32	5d	(*)	6 meses
I) <i>Klebsiella pneumoniae</i> (10031)	1	1	1	24	1:25	1 semana
J) <i>Escherichia coli</i> (10536)	1	1	1	24	1:20	2 semanas
K) <i>Streptococcus faecium</i> (10541)	5	(-----)	(-----)	(-----)	(-----)	24 horas
L) <i>Micrococcus luteus</i> (10240)	1	1	1	24	1:35	4 semanas
M) <i>Microsporium gypseum</i> (14683)	4	(-----)	(-----)	(-----)	(-----)	2 meses
T) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2601)	7	19	19	48	1:30	4 semanas
W) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (25619)	1	1	1	24	1:25	2 semanas
X) <i>Mycobacterium smegmatis</i> (607)	8	36	34	(*)	(-----)	2 semanas

(\*) Determinar la concentración que proporcione zonas de inhibición bien definidas y medibles.

TABLA 3. DIFUSION EN AGAR

Antibiótico	Medio		ml de medio en		Organismo de prueba	Volumen sugerido de inóculo estandarizado por 100 ml de medio ( ml )	Temperatura de incubación de las placas ( °C )
	Capa base	Capa siembra	Capa base	Capa siembra			
Anfotericina B	( --- )	19	( --- )	8	E	1.0	29 - 31
Ampicilina	11	11	21	4	C	0.5	32 - 35
Bacitracina	2	1	21	4	L	0.3	32 - 35
Bleomicina	35	35	10	6	X	1.0	32 - 35
Carbenicilina	2	1	21	4	W	(2)0.5	36 - 37.5
Dactinomicina	5	5	10	4	H	(1)	36 - 37.5
Dicloxacilina	2	1	21	4	A	0.1	32 - 35
Eritromicina	11	11	21	4	C	1.5	32 - 35
Gentamicina	11	11	21	4	D	0.03	36 - 37.5
Griseofulvina	20	21	6	4	M	(1)	30 (48h)
Kanamicina B	5	5	21	4	H	(1)	36 - 37.5
Mitomicina	8	8	10	4	H	0.5	36 - 37.5
Neomicina	11	11	21	4	A	0.2	32 - 35
Nistatina	( --- )	19	( --- )	8	T	1.0	29 - 31
Penicilina G	2	1	21	4	A	1.0	32 - 35
Polimixina B	9	10	21	4	F	0.1	36 - 37.5
Rifampicina	2	2	21	4	H	0.1	29 - 31

(1) Determinar la cantidad del inóculo por pruebas en placas.

(2) Usar la dilución de la suspensión que de el 25% de transmitancia, en lugar de la suspensión cosechada.

TABLA 4. SOLUCIONES DE TRABAJO

Antibiótico	Secado	Solvente Inicial	Diluyente	Concentración por ml	Almacenamiento en refrigeración	Diluyente final	Dosis media activada en mcg o U/ml	Factor de dilución
Anfotericina	1	(---)	Dimetilsulfóxido	1 mg (1)	Usar el mismo día	10	1.0 mcg	1.25
Ampicilina	NO	(---)	Agua destilada	1 mg	1 semana	3	0.1 mcg	1.25
Bacitracina Zinc	1	(---)	HCl 0.1 N	100 U	Usar el mismo día	1	1.0 U	1.25
Bleomicina	7	(---)	16	2 U	2 semanas	16	0.04 U	2.0
Carbenicilina	NO	(---)	1	1 mg	2 semanas	1	20.0 mcg	1.25
Dactinomicina	1	10000 mcg/ml en alcohol metílico	3	1 mg	3 meses	3	1.0 mcg	1.41
Dicloxacilina	NO	(---)	1	1 mg	7 días	1	5.0 mcg	1.25
Eritromicina	1	10000 mcg/ml en alcohol metílico	3	1 mg	14 días	3	1.0 mcg	1.25
Gentamicina	3	(---)	3	1 mg	1 mes	3	1.0 mcg	1.25
Griseofulvina	NO	(---)	Dimetilformamida	1 mg (4)	3 meses	3	5.0 mcg	1.25
Kanamicina B	NO	(---)	3	1 mg	1 mes	3	1.0 mcg	1.25
(usar patrón de Kanamicina)								
Mitomicina	NO	(---)	1	1 mg	14 días	1	1.0 mcg	1.25
Neomicina	1	(---)	3	1 mg	2 semanas	3	1.0 mcg	1.25
Nistatina	4	(---)	Dimetilformamida	1000 U (2)	Usar el mismo día	6	20.0 U	1.25
Penicilina G	NO	(---)	1	1000 U	4 días	1	1.0 U	1.25
Polimixina B	1	H <sub>2</sub> O destilada (3)	6	10000 U	2 semanas	6	10.0 U	1.25
Rifampicina	1	(---)	Alcohol metílico	1 mg	1 día	1	5.0 mcg	1.25

- (1) Diluciones mayores con DMS a 20 veces la concentración de cada punto de la curva.
- (2) Diluciones mayores con DMF a 20 veces la concentración de cada punto de la curva.
- (3) Añadir 2 ml de agua destilada por cada 5 mg del patrón de referencia.
- (4) Diluciones mayores con DMF a 20 veces la concentración de cada punto de la curva.

TABLA 5. METODO TURBIDIMETRICO

Antibiótico	Organismo	Medio	Volumen sugerido de inóculo	Temperatura
	Prueba	Líquido	estandarizado por 100 ml de medio (mililitro)	( °C )
Amikacina	A	3	0.1	36 - 37.5
Cloramfenicol	J	3	0.7	36 - 37.5
Estreptomcina	I	3	0.1	36 - 37.5
Gramicidina	K	3	1.0	36 - 37.5
Kanamicina	A	3	0.2	36 - 37.5
Rolltetraciclina	A	3	0.1	36 - 37.5
Tetraciclina	A	3	0.1	36 - 37.5

TABLA 6

Antibiótico	Soluciones de trabajo					Concentración de la curva patrón		
	Secado previo (método)	Disolvente inicial	Diluyente	Concentración (mg/ml)	Almacenamiento en refrigeración.	Diluyente final	Dosis media activada en mcg/ml	Factor de dilución
Amikacina	NO	( ---- )	Agua destilada	1 mg	2 semanas	Agua destilada	10.0	1.12
Cloramfenicol	NO	Alcohol etílico (a 10000 mcg/ml)	Agua destilada	1 mg	1 mes	Agua destilada	2.5	1.25
Estreptomcina	1	( ---- )	Agua destilada	1 mg	1 mes	Agua destilada	30.0	1.12
Gramicidina	1	( ---- )	Agua destilada	1 mg	1mes	Agua destilada	0.04	1.12
Kanamicina	NO	( ---- )	Agua destilada	1 mg	1 mes	Agua destilada	10.0	1.12
Rolltetraciclina	1	( ---- )	Agua destilada	1 mg	1 día	Agua destilada	0.24	1.12
Tetraciclina	NO	( ---- )	HCl 0.1 N	1 mg	1 día	Agua destilada	0.24	1.12

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Remington, G. "Pharmaceutical sciences". 16th edition. Mack Publishing Company. Easton Pennsylvania USA 1980. 1498-1513.
2. Lachman, L. "The theory and practice of industrial pharmacy". 3th edition. 1986. 639-663.
3. Helman, J. "Farmacotenia teórica y práctica". Ed. CECSA. México 1982. Tomo II y VIII. 415-444, 2353-2383.
4. Dick, J.G. "Analytical Chemistry". International student edition. Mc Graw-Hill Kogakusha, Ltd. Tokyo 1980. 100-136.
5. Connors, K.A. "Curso de análisis farmacéutico". Editorial Reverté. S.A. Barcelona. 1980. 21-30.
6. Jenkins, G.L. "Química farmacéutica cuantitativa". Editorial Atlante. México. 270-293.
7. Goodman, A. "Las bases farmacológicas de la terapéutica". 6a. edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina 1982. 1140-1155, 1197-1206.
8. AHFS. "Drug information". American Hospital Formulary Science. Editorial STAFF. USA 1992. 333-335, 1615-1620.
9. Litter, M. "Compendio de farmacología". 3a. edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires Argentina 1986. 571-610.

10. Martindale. "The extra pharmacopeia". 30th edition. The Pharmaceutical Press. London. 1993. 79-113.
11. "Drug". 47th. Facts and Comparisons Inc. USA. 1993. Chapter 10. 2164-2236.
12. "Ama drug evaluation". 4th. edition. American medical association. Chicago Illinois. 1279-1301.
13. Mc Van, Bárbara. "Referencias farmacéuticas". Manual de consulta para los profesionales de la salud. Ed. El Manual Moderno. México 1988. 1167-1169, 1310-1311.
14. The Merck Index. "An encyclopedia of chemicals and drugs". Ninth edition. Merck and Co., Inc. Rahway, N.J., U.S.A. 1976. 588-589, 839, 984-985.
15. Katayama T., et al. "Quantitative structure-hydrophobicity and structure-activity relationships of antibacterial Gramicidin S analogs". J. Pharm. Sci. 1994, 83 (9), 1357-1362.
16. Yoshida F., and Topliss J.G. "Unified model for the corneal permeability of related and diverse compounds with respect to their physicochemical properties". J. Pharm. Sci. 1996, 85 (8), 819-823.
17. The United States Pharmacopeia (USP) XXIII. U.S.A. 1995. 1071-1072, 1945-1948.

18. *Farmacopéa de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM)*. México 1995. 79-87, 1286-1288.
19. Kipp J.E., and Schuck D.F. "Computer simulation of the effect of temperature on pH". 1995. 84 (11), 1345-1349.
20. Burr, Irving W. "Statistical Quality Control Methods". *Statistical textbooks and monographs*. Vol. 16. Marcel Dekker Inc. New York, U.S.A. 1976. 200-235.
21. Bhattacharyya, Gouri K. y Johnson, Richard A. "Statistical concepts and methods". Ed. John Wiley and Sons. Singapore. 1977. 334-359.
22. Cantatore de Frank, Norma M. "Manual de estadística aplicada". Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina 1980. 259-290.
23. Chou, Ya-Lun. "Análisis Estadístico". Editorial Interamericana. 2a. edición. México 1986. 275-330, 774-777.
24. Walpole R.E., y Myers R.H. "Probabilidad y Estadística". McGraw-Hill/Interamericana de México. 3a. Edición. México 1997. 299-312, 488-496.
25. Davis B.D., Dulbecco R., et al. "Tratado de Microbiología". Salvat Editores S.A. 2a. Edición. Barcelona 1980. 130-132, 696-701.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA