

\$ 15000 =

UNIVERSITAS SCIENTIARUM

REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS

Volumen 8, N° 1: Enero-Junio de 2003

Esta Revista está indexada y referenciada
en Chemical Abstracts (CA)

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA





IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE POTENCIA MICROBIOLÓGICA DE NEOMICINA EN CREMA TÓPICA FABRICADA EN UNA PLANTA PRODUCTORA DE MEDICAMENTOS

Andrea Camacho, Janeth Arias

Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 N° 43-88, Bogotá

E-mail: jdcarias@javeriana.edu.co, andrea_camacho_duarte@hotmail.com

RESUMEN

Se estandarizó e implementó el procedimiento analítico para la determinación de potencia microbiológica de neomicina en crema tópica. Para ello se analizaron muestras provenientes de tres lotes piloto del producto, almacenadas en las siguientes condiciones: 20°C-60% humedad relativa, 30°C-70 humedad relativa y 40°C-80% humedad relativa. Se establecieron nueve tratamientos como base del diseño experimental, los cuales consistieron en combinaciones resultantes del método de extracción de la muestra con las condiciones de almacenamiento. Para separar el analito de interés del producto se utilizó extracción con éter, extracción con cloroformo y separación con equipo de ultrasonido. El método empleado en el análisis fue el de dosificación biológica descrito por la USP. Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos con éter fueron los más adecuados para la extracción de la muestra ya que presentaron halos de inhibición similares a los del estándar con el cual fueron comparados, se utilizaron como técnicas de siembra discos y pozos en el medio de cultivo.

Palabras clave: Control de calidad, antibiótico, neomicina, estandarización, potencia.

ABSTRACT

The analytical procedure for determination of microbiological potency of neomycin in topical cream was standardized and implemented. In order to that originating samples of three pilot batches of the product were analyzed, the samples were stored in the following conditions: 20°C-60% relative humidity, 30°C-70% relative humidity and 40°C-80% relative humidity. Nine processings settled down as it bases of the experimental design, which consisted of resulting combinations of the method of extraction of the sample with the conditions of storage. In order to separate the analito of interest of the product extraction with ether was used, extraction with chloroform and separation with ultrasound equipment. The method used in the analysis was the biological assay described by the USP. The obtain results showed that the processings with ether were adequated for the extraction of the sample since they presented inhibition zones similar to those of the standard with which they were compared, the used methods were cylinder-plate "plate" and discs in culture media.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las organizaciones necesitan cada vez más establecer sistemas eficientes de calidad para ser competitivas pudiendo así satisfacer las necesidades de los clientes y de la propia organización. Esta afirmación es también válida para la industria farmacéutica

y biotecnológica, en la que existe un conjunto de regulaciones que son de obligatorio cumplimiento para la posible comercialización de los productos. (Gómez, 1995).

En la industria farmacéutica, los conceptos de garantía de calidad, buenas prácticas de manufactura (BPM) y control de calidad consti-

tuyen aspectos muy importantes de la administración de la calidad, la cual se define como el aspecto de la función administrativa que determina y pone en práctica la "política de calidad", es decir la orientación y las intenciones generales de un organismo en lo que respecta a la calidad, en la forma como lo expresan y lo autorizan las autoridades superiores de dicho organismo. El control de la calidad es la parte de las BPM que se refiere al muestreo, especificaciones, y ensayo, como también a los procedimientos de organización, documentación y autorización que aseguren que los ensayos necesarios y pertinentes realmente se efectúen, y que no se permita la circulación de los materiales, ni se autorice la venta o suministro de los productos, hasta que su calidad haya sido aprobada como satisfactoria. El control de la calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe estar presente en todas las decisiones concernientes a la calidad del producto. (OMS, 1996)

La actividad o potencia de un antibiótico, puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones, obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia. (USP XXIV, 2000)

La neomicina es un antibiótico que forma parte del grupo de antibióticos aminoglucósidos, los cuales son utilizados principalmente en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gramnegativas aerobias. Los miembros de este grupo de antibióticos no son activos frente a microorganismos anaerobios. (USP XXIV, 2000)

MATERIALES Y MÉTODOS

La estandarización de la técnica para la determinación de potencia microbiológica de

neomicina en crema tópica (Betametasona 0.04% - Neomicina 0.5% - Clotrimazol 1.0%), se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de una Planta Productora de Medicamentos.

Preparación de soluciones estándar:

- a. Solución stock: A partir de estándar de referencia USP de neomicina sulfato, lote 45800L1 de potencia rotulada 782 μg neomicina/mg, se pesó el equivalente a 20 mg de neomicina en balón aforado de 20 mL y se completó a volumen con Buffer fosfato pH 8.
- b. Solución de referencia: De la solución stock preparada se tomó una alícuota de 2 mL, se colocó en balón de 100 mL y se llevó a volumen con Buffer fosfato pH 8 obteniendo una solución de concentración 0.02 mg/mL.
- c. Preparación de soluciones estándar para curva patrón: A partir de la solución de referencia se tomaron alícuotas de 1, 5, 10, 15 y 20 mL, se pasaron a balones de 50 mL y se llevó a volumen con Buffer fosfato pH 8. Estas soluciones se identificaron como S1, S2, S3, S4 y S5 con concentraciones finales de 0.4, 2, 4, 6 y 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de neomicina, respectivamente.
- d. Preparación de la muestra: A partir de la concentración rotulada de neomicina en el producto, se pesó una cantidad equivalente a 20 mg; para los tratamientos con éter y cloroformo esta cantidad se disolvió en 30 mL de Buffer fosfato pH 8 y en embudo de decantación se mezcló con 50 mL del respectivo solvente; se agitó manualmente y se hicieron 3 lavados con el mismo buffer, se descartó la fase orgánica y se recuperó la fase acuosa, se completó a volumen de 100 mL, a partir de esta solución se preparó una solución de concentración final 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de neomicina. Para la separación con equipo de ultrasonido,

se pesó la misma cantidad y se adicionaron 30 mL de buffer pH 8, se llevó a equipo de ultrasonido durante 50 minutos, después se completó a volumen y se preparó una solución de concentración final 4 µg/mL de neomicina.

Preparación del inóculo: Se utilizó como microorganismo de prueba una cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. El día anterior a cada ensayo se realizó un repique en caja TSA y se incubó 24h a 37°C. El día del ensayo se preparó una suspensión de microorganismo en solución salina estéril 0.9% que tenía una turbidez del 25% de transmitancia a 520 nm. De esta suspensión se tomó 1 mL por cada 100 mL de Medio Antibiótico No. 11 (preparado según las indicaciones de la casa comercial), mantenido a 45°C, el medio fue inoculado hasta obtener una suspensión homogénea.

Preparación de cajas de petri con medio de cultivo inoculado: Se colocaron las cajas correspondientes al análisis sobre una superficie nivelada. En cada una se sirvieron 10 mL de Medio Antibiótico No. 11 sin inocular y se dejó solidificar. Luego se sirvió una segunda capa de 6 mL del medio inoculado de manera que cubriera toda la base y se dejó solidificar. En cada caja se trabajaron 6 reservorios de los cuales 3 fueron para el estándar S3 y los otros tres para la muestra correspondiente y los demás estándares según fuera el caso.

Diseño experimental: Se establecieron nueve tratamientos y para el análisis de datos se realizó la técnica de análisis de varianza "ANOVA".

Para el tratamiento de los datos se partió de un modelo matemático unifactorial. Como estadístico de prueba se utilizó la distribución de probabilidad de Fisher con un nivel de confianza del 95%. Para reforzar la decisión tomada en el análisis de varianza, se realizó la prueba de Scheffe.

RESULTADOS

Siguiendo la metodología de dosificación biológica los resultados obtenidos para las técnicas de siembra tanto en pozos como en discos y al comparar los diferentes lotes con los métodos se encontró que los mayores halos de inhibición se evidencian al realizar la extracción con éter independientemente de la humedad relativa en las muestras. (Véanse tablas y gráficos).

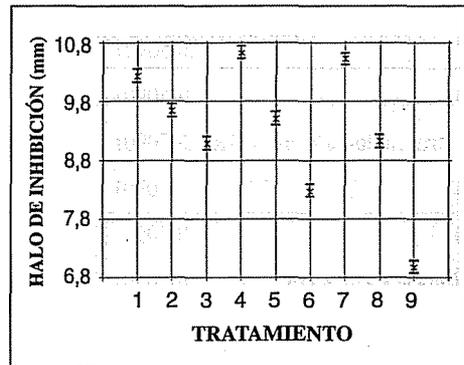


GRÁFICO 1. Para la técnica de siembra en discos los tratamientos 4 y 7 presentaron en promedio mayor halo de inhibición.

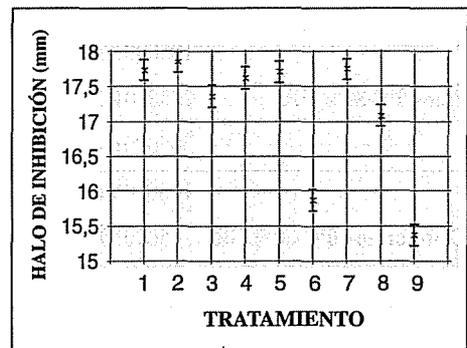


GRÁFICO 2. Para la técnica de siembra en pozos los tratamientos 1, 2, 4, 5 y 7 presentaron en promedio mayor halo de inhibición.

TABLA 1. Técnica de siembra : discos
(Valores promedio halos de inhibición)

Tratamiento	Lote	halo de Inhibición (mm)
1 Éter-20°C-60% HR	1050901	10,1
	2050901	10,5
	3050901	10,1
2 Cloroformo-20°C-60% HR	1050901	9,5
	2050901	9,7
	3050901	9,7
3 Ultrasonido-20°C-60% HR	1050901	9,4
	2050901	8,7
	3050901	9,2
4 Éter-30°C-70% HR	1050901	10,7
	2050901	10,6
	3050901	10,5
5 Cloroformo-30°C-70% HR	1050901	9,5
	2050901	9,5
	3050901	9,5
6 Ultrasonido-30°C-70% HR	1050901	7,5
	2050901	8,6
	3050901	8,7
7 Éter-40°C-80% HR	1050901	10,5
	2050901	10,6
	3050901	10,4
8 Cloroformo-40°C-80% HR	1050901	9,3
	2050901	9,2
	3050901	8,8
9 Ultrasonido-40°C-80% HR	1050901	7,1
	2050901	6,8
	3050901	7,1

TABLA 2. Técnica de siembra pozos
(valores promedio halos de inhibición)

Tratamiento	Lote	halo de Inhibición (mm)
1 Éter-20°C-60% HR	1050901	17,9
	2050901	17,7
	3050901	17,5
2 Cloroformo-20°C-60% HR	1050901	17,7
	2050901	17,9
	3050901	17,8
3 Ultrasonido-20°C-60% HR	1050901	17,5
	2050901	17,1
	3050901	17,4
4 Éter-30°C-70% HR	1050901	17,6
	2050901	17,6
	3050901	17,6
5 Cloroformo-30°C-70% HR	1050901	17,7
	2050901	17,7
	3050901	17,6
6 Ultrasonido-30°C-70% HR	1050901	14,4
	2050901	16,6
	3050901	16,6
7 Éter-40°C-80% HR	1050901	17,7
	2050901	17,7
	3050901	17,7
8 Cloroformo-40°C-80% HR	1050901	17,2
	2050901	16,9
	3050901	17,0
9 Ultrasonido-40°C-80% HR	1050901	15,8
	2050901	15,0
	3050901	15,3

TABLA 3. Técnica de siembra discos (valores promedio halos de inhibición)

Tratamiento	Lote	Halo de inhibición	
		(mm)	(S3)
4	1050901	10,7	10,6
Éter-30°C-70% HR	2050901	10,7	10,6
	3050901	10,5	10,5
7	1050901	10,5	10,5
Éter-40°C-80% HR	2050901	10,6	10,6
	3050901	10,4	10,5

TABLA 4. Técnica de siembra pozos (valores promedio halos de inhibición)

Tratamiento	Lote	Halo de inhibición	
		(mm)	(S3)
4	1050901	17,6	17,5
Éter-30°C-70% HR	2050901	17,6	17,5
	3050901	17,6	17,5
7	1050901	17,7	17,7
Éter-40°C-80% HR	2050901	17,7	17,7
	3050901	17,7	17,7

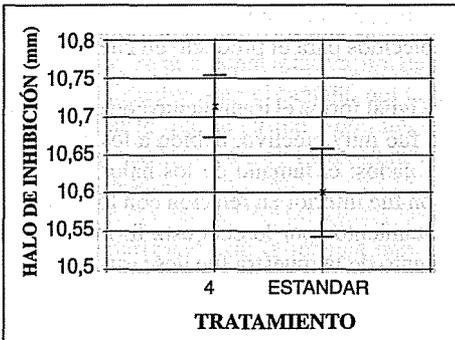


GRÁFICO 3. Para la técnica de siembra en discos el tratamiento 4 presentó en promedio mayor halo de inhibición que su estándar.

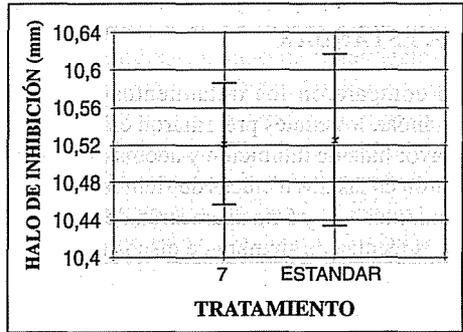


GRÁFICO 4. Para la técnica de siembra en discos el tratamiento 7 presentó en promedio igual halo de inhibición que su estándar.

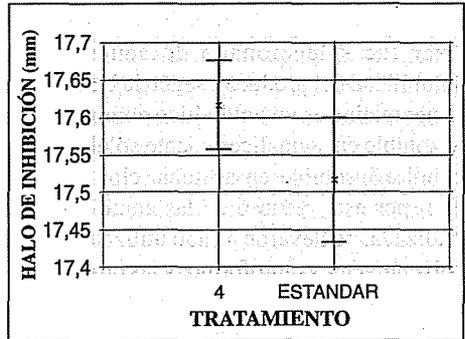


GRÁFICO 5. Para la técnica de siembra en pozos el tratamiento 4 presentó en promedio mayor halo de inhibición que su estándar.

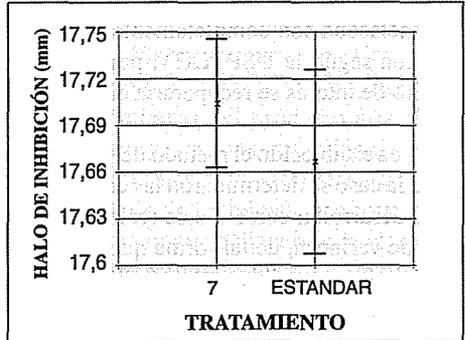


GRÁFICO 6. Para la técnica de siembra en pozos el tratamiento 7 presentó en promedio igual halo de inhibición que su estándar.

COMPARACIÓN DE TRATAMIENTOS VS. ESTÁNDAR

Se compararon los tratamientos 4 y 7 vs. estándar, los cuales presentaron en promedio mayor halo de inhibición y además se encontraron en las dos técnicas de siembra. Los tratamientos 1, 2 y 5 no aparecerán debido a que en la técnica de siembra de discos no presentaron en promedio halos de inhibición mayores a los anteriormente mencionados.

DISCUSIÓN

En la estandarización del procedimiento analítico para determinar la potencia de neomicina en crema tópica, en primera instancia, el método de separación del principio activo a analizar fue seleccionado de acuerdo a la solubilidad del producto; según la USP XXIV la neomicina es un antibiótico completamente soluble en agua, ligeramente soluble en alcohol e insoluble en acetona, cloroformo y éter, por esta razón 6 de las combinaciones realizadas se llevaron a cabo utilizando como solventes éter y cloroformo; y las otras 3 combinaciones se realizaron con equipo de ultrasonido con el fin de solubilizar la neomicina en el buffer a partir de la vibración ultrasónica. En los 9 tratamientos se tuvo en cuenta de igual forma la solubilidad de los otros dos principios activos del producto (Clotrimazol y Betametasona) y se estableció esta forma de solubilización ya que el clotrimazol y la betametasona son completamente insolubles en agua según la USP XXIV, por lo cual el analito de interés se recuperaría en el buffer.

Una vez establecido el método de separación, en cada caso se determinaron las combinaciones a desarrollar con el fin de realizar un análisis de varianza, de tal forma que durante el análisis fuera posible encontrar la magnitud con la que contribuía cada una de esas fuentes en la variación total. De esta forma se pretendía establecer si todos los tratamientos eran iguales entre ellos o por el contrario si alguno tenía influencia en el diámetro del halo de in-

hibición producido. Los resultados obtenidos muestran claramente que sí existe una diferencia en el tratamiento de la muestra con respecto al tamaño del halo producido lo que se ve reflejado en los tratamientos realizados con éter y cloroformo que fueron los que mayor halo de inhibición presentaron. Caso contrario lo ocurrido con la separación por ultrasonido que presentaba tamaños de halo inferiores con relación a los otros dos tratamientos.

Es importante anotar que las combinaciones realizadas con éter, presentaron mayor facilidad para la extracción de la muestra, ya que tanto la fase orgánica como la fase acuosa se diferenciaban totalmente, lo que no ocurrió con el cloroformo ya que la fase orgánica presentaba un color similar a la fase acuosa. En principio se pensó que había algún excipiente en el producto que estaba precipitando en el cloroformo, pero se realizó un pequeño ensayo disolviendo una cantidad determinada de principio activo (neomicina) en un volumen determinado de cloroformo, y resultó que parte de este principio activo se solubilizaba en el cloroformo, situación que no se esperaba debido a las características de solubilidad de la neomicina establecidas en la USP XXIV, por lo que para futuros análisis en el laboratorio de microbiología de la planta farmacéutica en la cual se llevó a cabo el estudio se descartó este tratamiento ya que podía interferir posteriormente en el valor de potencia del producto estando fuera de los límites establecidos para el producto en cuestión.

De igual forma el tratamiento con ultrasonido no fue muy efectivo, debido a los resultados arrojados; el tamaño de los halos de inhibición fue inferior en relación con los otros dos tratamientos por lo cual esta forma de tratamiento de la muestra fue descartada.

Las condiciones de almacenamiento del producto también fueron un factor importante a tener en cuenta, ya que las muestras analizadas correspondían a 3 lotes piloto conservados a 20°C-60% HR, 30°C-70% HR y

40°C-80% HR, y a partir de éstas se pretendía determinar si existía algún efecto en el tamaño del halo de inhibición con respecto a su almacenamiento por lo cual las combinaciones fueron establecidas teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado. En relación con el almacenamiento, el Codex Farmacéutico establece que la neomicina debe ser almacenada en contenedores herméticos, protegida de la luz y a temperaturas que no excedan los 30°C, pero en relación con la temperatura de almacenamiento en los tratamientos 4 y 7 no se presentó una disminución significativa en el diámetro del halo de inhibición, por el contrario el tratamiento 4 mostró un halo mayor comparado con el estándar y el tratamiento 7 presentó un halo igual al de su estándar lo que demuestra la estabilidad del producto a altas temperaturas de almacenamiento.

Otro de los factores que se tuvo en cuenta fue la humedad, que de acuerdo a lo planteado por Tolosa, et al., 1998, acelera la degradación de un fármaco, por lo que el envase desempeña una importante función en su conservación. En el caso de este estudio, la humedad relativa de almacenamiento estaba ligada a una temperatura, razón por la cual no existieron combinaciones como por ejemplo 20°C-80% HR, sino las muestras que fueron analizadas provenían del almacenamiento en cámaras de estabilidad que se encontraban en el laboratorio de desarrollo de la planta farmacéutica en la cual se desarrolló el trabajo. En este sentido, los resultados muestran claramente que la humedad relativa no tiene efectos significativos en el tamaño del halo de inhibición lo que se sustenta con los resultados obtenidos con el tratamiento 7 (40°C-80% HR).

En la estandarización de la técnica para el análisis de potencia de neomicina, siguiendo la metodología oficial de difusión en placa establecida por la USP XXIV, se comparó el método antes mencionado utilizando como técnicas de siembra discos impregnados y pozos en el medio de cultivo. Los resultados

muestran que los tratamientos 4 y 7 para discos impregnados presentan mayor halo de inhibición entre el conjunto de tratamientos y en relación con su estándar. De igual forma para la siembra en pozos de los mismos el tamaño de halo también fue similar a su estándar. De acuerdo a lo anterior, se hubiera podido escoger una de las dos técnicas de siembra, aunque los diámetros de los halos de inhibición fueron mucho menores para discos impregnados, estaban muy relacionados con el estándar, pero para el método de difusión en placa se descartó la técnica de discos impregnados ya que al realizar la curva patrón de estándares (trabajar 5 concentraciones diferentes del estándar de referencia) sugerida por la USP, el estándar 1 (S1), en ninguno de los análisis llevados a cabo presentó halo de inhibición, lo cual hacía imposible realizar el cálculo de potencia, por el contrario, en todas las siembras realizadas en pozos todos los estándares presentaban halo de inhibición y la curva patrón cumplía con los parámetros necesarios para realizar los cálculos respectivos.

CONCLUSIONES

- Se logró estandarizar e implementar la técnica para la determinación de potencia microbiológica de neomicina en crema tópica, a partir del establecimiento de tratamientos para analizar el principio activo de interés en tres lotes piloto.
- Fue posible establecer que el solvente adecuado para separar el principio activo (neomicina) del producto a analizar es el éter, ya que los tratamientos realizados con este solvente presentaron un mayor halo de inhibición con respecto a los tratamientos realizados con clorofor-mo y ultrasonido.
- En el caso del método de difusión en placa para la determinación de potencia, el inóculo fue un factor crítico. El repique a partir del cual se preparó la suspensión de

microorganismo para inocular el medio de cultivo, no debía tener un tiempo de siembra mayor a 24 horas ya que si no se trataba de un cultivo fresco, el microorganismo no crecía de manera uniforme impidiendo la lectura de los halos de inhibición.

- La forma adecuada de análisis para la determinación de potencia de neomicina en crema tópica, consistió en utilizar como solvente éter (para extraer el analito de interés) y como técnica de siembra el método de difusión en placa con pozos en el medio de cultivo.
- Las condiciones de almacenamiento del producto fueron muy útiles para establecer los tratamientos que se utilizaron en la estandarización de la técnica. Los resultados permiten concluir que el analito de interés es estable a temperaturas hasta de 40°C, ya que el tratamiento 7 (40°C-80% HR) en el método de difusión en placa utilizando como técnica de siembra pozos presentó un halo de inhibición igual al del estándar, lo que indica que al calcular el valor de potencia éste se encontrará en los límites establecidos para el producto.

LITERATURA CITADA

GÓMEZ BELTRÁN, J.R.; DELGADO FERNÁNDEZ, M. *Una experiencia práctica en la gestión de calidad en la industria farmacéutica*. Estudios Empresariales. 1995; (89): 54-59.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. *Buenas prácticas de manufactura Vigentes*. Serie de Informes Técnicos de la OMS (823). Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas. Informe 32. Ginebra, 1996.

THE PHARMACEUTICAL CODEX. *Incorporating the British Pharmaceutical Codex*. Eleventh edition. The Pharmaceutical Press, London, 1979.

TOLOSA CUBELA, V.; et. al. *Estabilidad de las tabletas de clorodiazepóxido 10 mg*. Instituto de Farmacia y Alimentos. Rev Cubana Farm, 1998; 32(1): 45-51.

USP XXIV. *United States Pharmacopoeia*, Convention INC. USP 24 NF19. January 1, 2000. Section (81), (111).