

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

EVALUACION MICROBIOLOGICA DE ERITROMICINA EN GRANULOS  
Y EN SUSPENSION DE USO FARMACEUTICO UTILIZANDO

Bacillus subtilis COMO UNA OPCION

Informe de tesis

Presentado por:

LILIAN ELIZABETH DEL PILAR AMIEL RODRIGUEZ

Para optar al título de

QUIMICO BIOLOGO

*Guatemala, septiembre de 1994*

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL  
06  
T(1649)

**JUNTA DIRECTIVA**

**DECANO**

**LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR**

**SECRETARIA**

**LICDA. ELEONORA GAITAN IZAGUIRRE**

**VOCAL I**

**LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ**

**VOCAL II**

**LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN**

**VOCAL III**

**LIC. MIGUEL ORLANDO GARZA SAGASTUME**

**VOCAL IV**

**BR. JORGE LUIS GALINDO AREVALO**

**VOCAL V**

**BR. EDGAR ANTONIO GARCIA DEL POZO**

**ACTO QUE DEDICO A**

**DIOS**

**VIRGEN MARIA**

**MIS PADRES:** René Rolando Amiel Durán  
Carmen de Jesús Rodríguez de Amiel

**MI HERMANO:** Rolando Alfonso Amiel Rodríguez

**MI ESPOSO:** Carlos Armando con amor

**DEDICATORIA ESPECIAL**

**A:**

**Mi madre Carmen de Jesús Rodríguez de Amiel quien fue, es y será por siempre mi mejor amiga, confidente y apoyo.**

**Donde quiera que esté, gracias madre.**

**Su amor y recuerdo me acompañan siempre.**

## INDICE

	No. DE PAGINA
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Historia	3
3.2 Generalidades de los antibióticos	4
3.3 Características de la eritromicina	4
3.4 Actividad antibacteriana	5
3.5 Mecanismos de Acción	5
3.6 Farmacocinética	6
3.6.1 Absorción	6
3.6.2 Distribución	7
3.6.3 Vías de administración y dosis	7
3.7 Valoración de la eritromicina	8
3.7.1 Método turbidimétrico	8
3.7.2 Método de difusión en Agar	8
3.8 Características generales de los Microorganismos	9
3.8.1 <u>Bacillus subtilis</u>	9
3.8.2 <u>Micrococcus luteus</u>	11
4. JUSTIFICACIONES	12
5. OBJETIVOS	13
6. HIPOTESIS	14
7. MATERIALES Y METODOS	15
8. RESULTADOS	22
9. DISCUSION DE RESULTADOS	24
10. CONCLUSIONES	26
11. RECOMENDACIONES	27
12. REFERENCIAS	28
13. ANEXOS	32

1.

## RESUMEN

El presente trabajo comprende una evaluación de la potencia antibiótica de eritromicina en gránulos y en suspensión fabricadas por una misma casa farmacéutica a través del método de difusión en agar con discos de papel filtro, al igual que establecer si la potencia antibiótica declarada en las etiquetas del producto, cumple con las especificaciones de control de calidad.

En un total de 35 muestras analizadas, se utilizó el microorganismo Micrococcus luteus ATCC 9341 como microorganismo oficial designado por COGUANOR (Leyes guatemaltecas obligatorias) NGO 6042 hl, así como el Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norte América, y se comparó con los resultados obtenidos utilizando Bacillus subtilis ATCC 6633 como microorganismo de prueba avalado por la Farmacopea Europea. Todas las muestras se hallaron entre los límites permitidos tanto por el Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norte América, como por la propuesta COGUANOR NGO 6042 hl, que va de 95% al 110% de eritromicina. En conclusión, no existe diferencia significativa si se utiliza Micrococcus luteus, ATCC 9341 o Bacillus subtilis ATCC 6633 en la determinación de la potencia antibiótica de eritromicina por el método de difusión en agar, aunque resultó más fácil de trabajar con este último debido a su resistencia, manejo, claridad en los halos producidos y mantenimiento de la cepa.

## INTRODUCCION

La eritromicina es considerada un antibiótico de amplio espectro, utilizado para atacar un gran número de microorganismos, especialmente, aquellos que se reproducen activamente (1,2).

Para determinar la cantidad de eritromicina presente en un medicamento, se hace necesario utilizar métodos de laboratorio, los cuales miden la cantidad real de eritromicina presente en la droga (3-5).

Existen métodos químicos y microbiológicos para medir la concentración de eritromicina presente en un fármaco. Entre los métodos microbiológicos existentes se encuentran el turbidimétrico y el de difusión de placa, siendo el último el aplicado por las Normas Guatemaltecas Obligatorias (COGUANOR), el cual utiliza el microorganismo indicador Micrococcus luteus ATCC 9341, referido por la Farmacopea Americana (6-8), el cual requiere de condiciones críticas en el manejo del microorganismo. Por esta razón se pretende estandarizar el método Difusión en Agar usando Bacillus subtilis (ATCC 6633) como microorganismo de prueba, un microorganismo no patógeno sumamente resistente a los efectos letales del calor, capaz de producir resultados estadísticamente equivalentes de potencia antibiótica, además establecer si los diferentes preparados de eritromicina en gránulos y en suspensión a trabajar cumplen con los estándares de potencia declarados en la etiqueta del fármaco.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Historia

El control oficial de los antibióticos fue iniciado en los Estados Unidos por la Food and Drug Administration (FDA) en el año de 1938, controlándose los siguientes factores: Potencia, demostración de no toxicidad y contenido de humedad (10).

La Organización Mundial de la Salud, publica periódicamente recomendaciones de estándares internacionales para productos farmacéuticos a través de sistemas, como Farmacopea Internacional, Crónicas de la Organización Mundial de la Salud, Informes Técnicos, Reuniones, Seminarios, etc. (11-13).

En el año 1976 fueron fijados los criterios analíticos para evaluar la calidad de los medicamentos, según los cuales, las normas y valoraciones que más utilidad tienen para la evaluación de la calidad son la identidad, pureza, actividad y acción de los productos farmacéuticos y, según la naturaleza del producto, pueden fundamentarse en reacciones químicas, físicas o biológicas (14).

En Guatemala en 1985 se emitió el Reglamento para el control de medicamentos, estupefacientes, psicotrópicos y productos de tocador e higiene personal, del hogar y establecimientos farmacéuticos. En dicho documento se definió el concepto de control de calidad (Art. 5) como el procedimiento que tiene por objeto asegurar en forma constante durante todo su proceso, la elaboración de lotes de productos conforme a las especificaciones de identidad, potencia, pureza y demás requisitos establecidos en sus respectivas monografías (15).

Es también control de calidad el que se realiza, en cualquier momento, sobre el producto terminado, para comprobar si mantiene sus características iniciales. Se señala, asimismo, que la responsabilidad de la calidad de los productos a que se refiere el presente reglamento, corresponde a los fabricantes, importadores y distribuidores (Art. 116).

Existe un Departamento (gubernamental) de Control, encargado de la supervisión, verificación y evaluación de la calidad de los medicamentos, así como de los establecimientos fabricantes o distribuidores, en base al cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura. Dicho departamento cuenta con el apoyo del Laboratorio Oficial, Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) de la Dirección General de Servicios de Salud.

Su acción, sin embargo, se limita a las operaciones inherentes al registro de tales productos (16).

### 3.2 Generalidades de los antibióticos

3.2.1 Antibiótico: Sustancia producida por un microorganismo vivo, la cual en concentraciones bajas mata o perjudica a otros microorganismos sin dañar a su productor. Es un término que designa a una droga que contiene una cantidad de sustancia química que es producida por un microorganismo, síntesis química, y que en solución diluida tiene la capacidad de inhibir o destruir microorganismos (7,17).

3.2.2 Potencia antibiótica: Es el poder de un antibiótico de inhibir el crecimiento bacteriano y es directamente proporcional a la concentración del mismo. La potencia se expresa en Unidades Internacionales (UI) (7).

3.2.3 Eficacia de un antibiótico: Desde el punto de vista terapéutico, se demuestra por la inhibición que efectúa sobre un microorganismo específico, bajo condiciones especiales (18,19).

3.2.4 La disminución de la actividad antibacteriana se demuestra a través de medios de cultivo de reconocida calidad en valoraciones microbiológicas y las cepas de los microorganismos a utilizar deben ser 100 por ciento puras. Como por ejemplo de American Type Culture Collection (ATCC) (7,20).

### 3.3. Características de la eritromicina.

La eritromicina fue descubierta en el año 1952 por McGuire y colaboradores en los productos metabólicos de una cepa de Streptomyces erytheus, obtenida originalmente de una muestra de suelo procedente del archipiélago Filipino (21-23).

La eritromicina es de color blanco, débilmente hidróscopica, poco soluble en agua (solubilidad que disminuye con la elevación de la temperatura), pero de fácil solubilidad en alcohol, cloroformo y éter, soluble en ácido clorhídrico diluido y metanol. En solución ácida es inestable, pero es estable por varias semanas en soluciones neutras refrigeradas a 4° C, ya que pierde su actividad rápidamente a 20° C (8,22,23).

La fórmula de la eritromicina  $C_{37} H_{67} NO_{13}$  muestra que es uno de los antibióticos macrólidos, llamados así, por contener un anillo de lactona de muchos miembros al que se une uno o más desoxiazúcares. Se trata en realidad de glucósidos, donde la lactona-aglucona está unida a dos azúcares, uno de los cuales es un aminoazúcar. Además, el anillo posee uno o dos grupos cetónicos (Figura 1) (10,21).

El nitrógeno amínico hace a la eritromicina una base poco soluble en agua y de sabor amargo, por ello se utiliza generalmente en la forma de los siguientes derivados: a) sales ácidas, como el lactobionato de eritromicina que es soluble en agua y conveniente para la administración oral por ser prácticamente insípido; b) ésteres del grupo hidróxilo de la desosamina como el estolato de eritromicina, administrado por vía oral y el etil succinato de eritromicina por vía parenteral y oral, ambos insolubles en agua (Tabla 2) (10,22,24).

### 3.4 Actividad Antimicrobiana de la Eritromicina

La eritromicina puede ser bactericida o bacteriostática, según el microorganismo y la concentración de la droga.

La actividad bactericida es máxima contra un pequeño número de microorganismos de división rápida, la cual aumenta marcadamente cuando el pH del medio es de 5.5 a 8.5 (8,22,24).

Actúa especialmente sobre a) Cocos Gram positivo como Streptococcus pneumoniae, pyogenes y Staphylococcus aureus; b) Bacilos Gram positivo como Corynebacterium diphtheriae, Bacillus anthracis y el género Clostridium; c) Cocos Gram negativo como Neisseria meningitidis y Neisseria gonorrhoeae; d) Bacilos Gram negativo como Haemophilus influenzae; e) bacterias filamentosas como Actinomyces israelii; f) espiroquetas como Treponema pallidum y protozoarios como Entamoeba histolytica; g) las rickettsias que son poco susceptibles, algunos micoplasmas y Chlamydia sp. Por estas razones la eritromicina es considerada un antibiótico de amplio espectro, siendo efectivo especialmente sobre bacterias que se reproducen activamente (Tabla 1) (1,2,10,22,25).

### 3.5 Mecanismos de Acción

Los fármacos antimicrobianos actúan en una de cuatro formas principales:

- Inhibición de las reacciones metabólicas esenciales en el citoplasma del microorganismo. Su toxicidad selectiva depende de la inhibición de una reacción esencial para el microorganismo.
- Interferencia en la síntesis de la pared celular bacteriana, la cual se rompe haciendo que la célula estalle en un medio ambiente hipotónico.
- Alteración de la estructura de la membrana plasmática vecina a la superficie interna de la pared celular.
- Trastornos de la síntesis de proteínas por: interferencia con la síntesis de ARN (ácido ribonucleico) o comúnmente por la acción a nivel del ribosoma. Siendo esta última la forma utilizada por la eritromicina, que al unirse a la subunidad 50S del microorganismo sensible, impide el proceso de translocación, es decir, el movimiento del ribosoma a lo largo del ácido ribonucleico mensajero, acción necesaria para el agregado del aminoácido correcto a la cadena polipeptídica que formará la proteína. En esta forma se interrumpe la formación de los polipéptidos proteínas esenciales para las funciones vitales de las bacterias (23,26).

### 3.6 Farmacocinética

#### 3.6.1 Absorción:

La eritromicina se absorbe en el tracto intestinal, pero en forma de base es inactivada por la acidez del jugo gástrico, evitándose esta acción por la administración de la droga en una tableta con cubierta entérica. Es preferible utilizar el estearato de eritromicina que no sufre alteración en el estómago e intestino (duodeno), liberando la base al hidrolizarse. Se recomienda utilizar el estearato de eritromicina en forma de suspensión para su administración pediátrica. Se aconseja tomar la eritromicina en horas intermedias de las comidas, ya que los alimentos en el estómago demoran su absorción (1,23,28).

### 3.6.2

#### Distribución:

La eritromicina se difunde rápidamente penetrando en los órganos, particularmente el hígado, bazo y pulmón. Pasa rápidamente a los líquidos pleural y peritoneal, pero poco al líquido cefalorraquídeo. Es capaz de cruzar la barrera placentaria, siendo uno de los pocos antibióticos que llega a penetrar hasta el líquido prostático. Con el estolato y el estearato se logran concentraciones séricas de 5 a 15 ug/ml en un plazo de 1 a 4 horas después de administrar una dosis de 500 mg. (21,28,29).

La concentración en el líquido cefalorraquídeo es aproximadamente 20 por ciento de la concentración plasmática mientras que las concentraciones biliares son aproximadamente superiores a las del plasma (30-32).

Sólo del 5 al 12 por ciento de la eritromicina administrada por vía oral es excretada en forma activa por la orina, aunque la cifra aumenta hasta un 12 a 15 por ciento después de una dosis administrada por vía intravenosa. Cuando se administran dosis elevadas de eritromicina por vía oral, las heces pueden contener hasta 0.5 mg/g. (1,21).

El antibiótico se concentra en el hígado siendo la principal forma de excreción por la bilis, que puede contener hasta 250 ug/ml cuando las concentraciones plasmáticas son muy altas (1).

La vía media plasmática de la eritromicina es de 1.6 horas aproximadamente (28).

### 3.6.3

#### Vías de Administración y Dosis:

- a) Preparados orales: la eritromicina en forma de base, como el estearato de eritromicina, el estolato de eritromicina y el etil succinato de eritromicina, se obtiene en una alta variedad de preparaciones para su administración oral (tabletas, tabletas masticables, cápsulas, suspensiones y gotas). La dosis habitual para adultos es de 1 a 2 gramos por día en tomas iguales a intervalos generalmente de 6 horas, según la naturaleza y severidad de la infección. La dosis habitual para adultos es de 1 a 2 gramos por día en tomas iguales a intervalos generalmente de 6 horas, según la naturaleza y severidad de la infección. La dosis para niños es de 30 a 50 mg/kg de peso al día, dividiéndola en cuatro porciones (21,24,28,33).

- b) Preparados intramusculares: la dosis habitual es de 0.5 a 1 gramo cada 6 horas durante 4 semanas, recomendándose poco por ser dolorosa y reservada para el tratamiento de infecciones severas (1,24,28).

La eritromicina rara vez causa efectos secundarios severos. En las reacciones alérgicas se presenta fiebre, eosinofilia y erupciones cutáneas, que pueden aparecer solas o combinadas y desaparecer al suspender el tratamiento. La hepatitis colestática es el efecto secundario más notable, se debe principalmente al estolato de eritromicina y pocas veces a otros preparados (10,21).

### 3.7 Valoración de la Eritromicina

La eritromicina se valora generalmente por métodos microbiológicos, en los cuales existe una comparación contra la actividad antimicrobiana de un preparado patrón (7,8,24).

Existe un estándar internacional de eritromicina base, siendo una unidad internacional la actividad de 0.001053 mg. (eritromicina dihidratada), pero en la práctica la actividad de la droga se expresa en peso (7).

Entre los métodos microbiológicos para determinar la potencia de eritromicina están el de difusión en placa y el turbidimétrico.

#### 3.7.1 Método Turbidimétrico

El método turbidimétrico utiliza el microorganismo Staphylococcus aureus y mide la luz diseminada como decrecimiento de la luz transmitida a través de la solución. La turbidez está regida por el crecimiento de la bacteria que depende de la concentración del antibiótico, a mayor turbidez menor inhibición del microorganismo y viceversa. La turbidez se mide mediante un espectrofotómetro.

#### 3.7.2 Método de difusión en Agar

Principio de difusión: Es la serie de eventos que pueden ocurrir cuando un antibiótico se difunde

a través de agar en el que existe presencia de células bacterianas capaces de reproducirse en el medio.

- **Leyes de difusión:** La difusión es el proceso por el cual los movimientos al azar de las moléculas transfieren la materia de una posición a otra. Describen los cambios de concentración que se dan en el tiempo, en cada punto en el agar. Ciertas circunstancias particulares pueden hacer inaplicables las leyes de difusión como son la precipitación en el medio y la evaporación (38).
- **Leyes de crecimiento:** Describen la frecuencia de producción de células y constituyentes celulares, deciden la frecuencia de formación de constituyentes que pueden combinarse con antibióticos (receptores celulares) y describen la relación entre célula y metabolismo (39).
- **Zonas de inhibición:** La aplicación de las leyes de difusión en zonas de inhibición antibiótica se llevó a cabo por primera vez en el año de 1946 por Cooper y Woodman y consiste en la difusión del antibiótico, contenido en discos de papel filtro, a través de una capa de agar solidificado que contiene el microorganismo. La zona de inhibición es el área alrededor del disco donde se ha difundido la solución del antibiótico, cuyo tamaño dependerá de la concentración de este último (36,38).

El método oficial de referencia tanto del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos de Norte América como de COGUANOR (Normas Guatemaltecas Obligatorias) para la determinación de potencia de eritromicina es por difusión en placa utilizando el microorganismo Micrococcus luteus cepa ATCC 9341.

### 3.8. Características Generales de los Microorganismos

#### 3.8.1 Bacillus subtilis

Es un bacilo Gram positivo en forma de bastón, raramente se presenta encadenado, (recto o casi recto), de 0.3 a 2.2 por 1.2 a 7.0  $\mu\text{m}$ . Presenta un flagelo peritrico. Es aerobio o anaerobio facultativo, catalasa positivo, oxidasa positivo o negativo, reductor de nitratos, metaboliza

compuestos aromáticos e hidroxiaromáticos, hemólisis variable, rápida digestión de la caseína. Es formador de endosporas o más comúnmente llamadas esporas (4,32).

La célula madre portadora de la endospora se llama esporangio (una por célula), y es de una particularidad característica del género Bacillus. Las endosporas bacterianas son estructuradas redondas u ovales altamente refractarias, resistentes a los efectos letales del calor y sobreviven en la naturaleza en estado de latencia por largos períodos, las endosporas se localizan en posición central dentro del esporangio y éstas ya maduras pueden ser liberadas como resultado de lisis. La formación de la endospora se ve afectada por factores como temperatura de crecimiento, pH del medio, aereación, presencia de minerales, y presencia del carbono y nitrógeno (4,38).

Las fases de formación de endosporas incluyen:

- |          |   |
|----------|---|
| Fase 0   | Crecimiento de la célula vegetativa.  |
| Fase I   | Presentación, en DNA (ácido desoxirribonucleico), procede a la formación de un filamento axial.   |
| Fase II  | Septación, separación de los cromosomas, dando como resultado la formación de una célula asimétrica.  |
| Fase III | Engolfamiento de la preespora, la membrana de la espora en desarrollo se separa por completo de la membrana de la célula madre y rodea el protoplasto de la espora. |
| Fase IV  | Se inicia la formación de la corteza.   |
| Fase V   | Las cubiertas de las esporas son sintetizadas.  |
| Fase VI  | Se da el desarrollo de la refractabilidad y resistencia al calor, y la maduración de la espora.   |
| Fase VII | Lisis del esporangio y liberación de la espora madura (4.38).   |

La transformación de una endospora latente en una célula vegetativa usualmente involucra tres procesos de secuencia que se conocen como activación, germinación y sobrecrecimiento (40).

La activación es un proceso que se lleva a cabo en una endospora lista para germinar; y por lo tanto, es el proceso responsable de la ruptura de la latencia. No se conoce un procedimiento generalmente específico para activar las endosporas. El método usualmente empleado es el tratamiento de calor por espacio de 10 a 30 minutos, o por envejecimiento uniforme a bajas temperaturas.

La germinación es el cambio de una endospora del estado latente al metabólicamente activo. Los cambios principales en esta etapa son: la despolarización y la excreción de los constituyentes de la espora acompañada por la pérdida de refractibilidad óptica, esto o la germinación pueden ser iniciadas por ciertos aminoácidos, ribósidos y azúcares.

Tras completarse la germinación, la joven célula vegetativa emerge, se alarga y divide (19,39).

El sobrecrecimiento se define como el desarrollo de una célula vegetativa a partir de una endospora germinada.

### 3.8.2

#### Micrococcus luteus

Es un coco Gram-positivo perteneciente al género Micrococcus, de forma esférica de 1.0 a 2.0 um de diámetro, se presenta en forma de racimos o paquetes, aerobio estricto, característicamente se divide en más de un plano o irregularmente en forma de racimos, en paquetes tetraédricos o cúbicos, usualmente inmóvil y no fermenta la glucosa (32,39).

El componente más importante de su pared celular es una sustancia polimérica llamada peptidoglucán, la cual está formada por aminoácidos, carbohidratos y lípidos que le proporcionan la estructura rígida a la pared celular de la bacteria y que en gran medida determina su forma.

Las colonias en medio antibiótico I (Tabla 4), son amarillas, amarillo-verdosas o de color naranja, algunos cultivos forman un pigmento violeta difuso en el centro en medio antibiótico I. Crece en cloruro de sodio al 5 por ciento, siendo su crecimiento óptimo a 30° C. no es patógeno hacia plantas y animales. Se presenta comúnmente en la suciedad, basura, agua, piel del hombre y otros animales (3,32).

4.

#### JUSTIFICACIONES

Para evaluar la potencia antibiótica de la eritromicina, la Farmacopea Americana establece la utilización de Micrococcus Luteus (ATCC 9341) como microorganismo de referencia.

El mantenimiento de dicha cepa es sumamente difícil debido a los estrictos controles de humedad y temperatura que se requieren para su crecimiento, lo que a su vez puede disminuir la vida media del microorganismo.

Los factores mencionados anteriormente establecen la necesidad de estudiar otros microorganismos alternativos para la evaluación de dicho antibiótico y cuyo empleo minimice las desventajas de utilizar microorganismos exigentes.

Por esta razón se evaluará la utilización de Bacillus Subtilis (ATCC 6633) como una opción. La formación de esporas hace de este microorganismo una cepa sumamente resistente a los efectos letales del calor, por lo que puede sobrevivir en la naturaleza en estado de latencia por largos períodos. Así mismo su crecimiento masivo sobre agar facilita la formación de halos de inhibición bien definidos, y la capacidad de proporcionar igualdad de resultados estadísticamente equivalentes. El uso de este microorganismo permitirá establecer lineamientos propios adaptados a las condiciones de nuestro país, lo que repercutirá en un mejor control y efectividad terapéutica.

5.

## OBJETIVOS

### GENERAL:

Normar el uso de Bacillus subtilis ATCC 6633 como un microorganismo alternativo para medir la potencia de eritromicina por COGUANOR (Normas Guatemaltecas Obligatorias).

### ESPECIFICOS:

- Comprobar que la medición de potencia antibiótica de eritromicina utilizando tanto Bacillus subtilis como Micrococcus luteus proporciona resultados análogos.
- Demostrar por medio de un análisis estadístico que el método microbiológico de Difusión en Agar utilizando Bacillus subtilis ATCC 6633 es preciso, exacto y específico para determinar la potencia antibiótica de eritromicina en Guatemala.
- Comprobar si la concentración de eritromicina indicadas en las etiquetas de los medicamentos seleccionados para efectuar el presente trabajo, tanto en gránulos como en suspensión, es la correcta.

6.

## HIPOTESIS

- La utilización de Bacillus subtilis ATCC 6633 provee resultados estadísticamente equivalentes al empleo de Micrococcus luteus ATCC 9341 en la determinación de la potencia antibiótica de eritromicina por el método de difusión en agar.
- La concentración real de eritromicina es menor que la indicada en las etiquetas del medicamento comercial.

7. **MATERIALES Y METODOS**

7.1 **Universo de trabajo**

35 muestras a trabajar con cada uno de los microorganismos (Bacillus subtilis ATCC 6633 y Micrococcus luteus ATCC 9341).

7.2 **Medios**

7.2.1 Recursos humanos:

Autora: Lilian Elizabeth del Pilar Amiel Rodríguez.

Asesor: Licenciado Sergio Iván Castillo Centeno.

Coasesoras: Licenciada Jaqueline Schaemaker  
Licenciada Vivian Irene González López.

7.2.2 Recursos físicos:

Industria Farmacéutica ABBOTT Laboratorios, S.A.

7.2.3 Recursos materiales:

7.2.3.1 Equipo:

- Incubadora bacteriológica (con precisión de más o menos 0.5° C).
- Espectrofotómetro con longitud de onda rango de 340 a 960 nm.
- Agitador.
- Baño María.
- Contador de colonias.
- Autoclave.
- Mechero.
- Vernier.

#### 7.2.3.2

##### Material:

- Pinzas.
- Asa de cultivo.
- Discos de papel filtro de 1/2 plg. de diámetro.
- Cajas de petri de 20 x 100 mm.
- Botellas Roux.
- Balones aforados.

#### 7.2.3.3

##### Medios de Cultivo (Anexo 1)

- Medios de Inóculo para suspensión de esporas.
- Caldo de Esporulación.
- Medio Antibiótico No. 1.
- Medio Antibiótico No. 5.
- Medio Antibiótico No. 11.

#### 7.2.3.4

##### Reactivos

- Solución amortiguadora pH 8 de fosfato de potasio 0.1M (solución disolvente).
- Fosfato dibásico de potasio.
- Fosfato monobásico de potasio.
- Agua.
- Metanol absoluto.
- Solución salina estéril al 0.85 por ciento.
- Eritromicina base (1 g equivalente a 972 mg de eritromicina).

### 7.3

#### Metodología

#### 7.3.1

##### Preparación del Estándar de Trabajo

A partir de la eritromicina base, se preparó una solución stock de eritromicina, con una concentración de 1000 mcg/ml utilizando metanol absoluto como solvente. Luego se preparó a partir de ella, un estándar base de trabajo cuya concentración fue de 100 mcg/ml empleando buffer de fosfatos pH 8 como solvente. A partir de esta solución de eritromicina, se prepararon 5

estándares para preparar la curva estándar, con concentraciones para el ensayo con Bacillus subtilis de S1 = 1, S2 = 2, S3 = 4, S4 = 8 y S5 = 16 mcg/ml y S1 = 0.25, S2 = 0.5, S3 = 1.0, S4 = 2.0 y S5 = 4. mcg/ml para el ensayo con Micrococcus luteus (Tabla 3) (3,7).

7.3.2 Preparación de la suspensión de trabajo de los microorganismos.

7.3.2.1 Ensayo con Micrococcus luteus (según recomendaciones de COGUANOR)

Se resuspendió un liofilizado de la cepa ATCC 9341 con 1 ml de solución salina estéril y se inocularon varios tubos con medio antibiótico No. 1 en forma inclinada, incubando a una temperatura entre 32-35 ° C. Se lavó el crecimiento del microorganismo en toda la superficie del medio con 3 ml de solución salina fisiológica estéril. Se transfirió la suspensión del lavado a una botella Roux que contenía 250 ml. del medio antibiótico No. 1 (Tabla 4).

La botella debió moverse para permitir que la suspensión se pusiera en contacto con toda la superficie del medio de cultivo. Se incubó entre 32 y 35° C por 24 horas.

Se agregaron 50 ml de solución de cloruro de sodio al 0.85 por ciento estéril y unas perlas de vidrio para lavar el crecimiento de la superficie del medio de cultivo. Esta suspensión concentrada debió pasarse a un frasco estéril de 300 ml y se almacenó en refrigeración.

Se prepararon 10 ml de una suspensión de la cepa a partir del concentrado, agregándole solución salina hasta obtener una transmitancia de 25 por ciento más menos 1 por ciento leída en el espectrofotómetro a 500 nm. Esta solución se mantuvo estable por dos semanas, refrigerada.

7.3.2.2 Ensayo con Bacillus subtilis (según Farmacopea Europea)

Se reconstituyó el contenido de un cultivo liofilizado de Bacillus subtilis en 1 ml. de solución salina. Se inocularon varios tubos conteniendo cada uno 10 ml de medio de inóculo para suspensión de esporas en forma inclinada y se incubó por 24 horas a 37° C. Los cultivos pueden ser mantenidos por un mes a 5° C (Tabla 4).

Se suspendió un tubo inoculado con 2.5 ml de solución salina y se transfirió a un Erlenmeyer conteniendo 100 ml del medio de inóculo para suspensión de esporas. Se incubó 24 horas a 32° C con agitación A 240 rpm hasta que la esporulación fuera evidente en un 90 por ciento bajo observación microscópica. Se removieron las esporas por medio de centrifugación y se resuspendieron en 4 ml de agua destilada estéril.

### 7.3.3 Preparación de la muestra de ensayo

7.3.3.1 Tabletas. Se pesó 20 tabletas obteniéndose la masa promedio por tableta. Se trituró las mismas hasta obtener un polvo fino, se pesó una cantidad equivalente a 100 mg de eritromicina según lo declarado en la etiqueta.

7.3.3.2 Gránulos para suspensión. Se disolvió el polvo en la cantidad especificada de agua destilada y se tomó una cantidad de la suspensión preparada equivalente a 100 mg. de eritromicina, según lo especificado en la etiqueta.

En las dos presentaciones se procedió de la siguiente forma:

Se transfirieron los 100 mg. de eritromicina a un valor aforado de 100 ml. agregando 50 ml de metanol absoluto y agitando por una hora, completando el volumen con metanol (se efectuó un filtrado en el caso de las tabletas y de los gránulos para suspensión) descartándose los primeros 10 ml de la solución y se procedió a tomar una alícuota de 10 ml transfiriéndose a un valor aforado de 100 ml. completando el volumen con buffer de fosfatos PH 8 para obtener una concentración final de 1 mg/ml.

### 7.3.3.3 Ensayo con Bacillus subtilis

Se transfirieron 0.4 ml de la dilución anterior de la muestra a un balón aforado de 100 ml y ajustar a volumen con la solución buffer de fosfatos pH 8. Esta fue la preparación de la muestra de ensayo con una concentración de eritromicina igual a 3.4 mcg/ml (Tabla 3).

#### 7.3.3.4 Ensayo con Micrococcus luteus

Se transfirió 0.1 ml. de la dilución de 1 mg/ml a un balón aforado de 100 ml y se ajustó el volumen con buffer de fosfato pH 8, obteniéndose una concentración de eritromicina igual a 1 mcg/ml (Tabla 3).

#### 7.3.4 Preparación de Placas de Ensayo

En ambos casos se utilizaron 3 cajas de petri para cada uno de los estándares y 4 cajas de petri por muestra.

Capa base: Se distribuyeron en cada una de las cajas de petri, 20 ml para Bacillus subtilis y 21 ml para Micrococcus luteus de medio estéril correspondiente para cada ensayo (antibiótico No. 5 y No. 11 Bacillus subtilis y Micrococcus luteus, respectivamente), dejando enfriar con la tapadera entreabierta para evitar la condensación de agua (Tabla 4)

##### 7.3.4.1 Micrococcus luteus

Capa inoculada:

Se inoculó el medio antibiótico No. 11, agregando 1.5 ml de la suspensión de trabajo para cada 100 ml de medio a una temperatura entre 48 a 50° C. Se agregaron 4 ml de esta suspensión sobre la capa base contenida en las cajas de petri, repartiéndose cuidadosamente por toda la superficie a manera de obtener una capa homogénea, la cual se dejó enfriar para evitar la condensación del agua.

##### 7.3.4.2 Bacillus subtilis

Capa inoculada:

Se inoculó el medio antibiótico No. 5, agregando 1 ml de la suspensión de esporas por cada 200 ml de medio a una temperatura de 54° C. Se agregaron 5 ml de esta suspensión a la capa base siguiendo las mismas precauciones que para Micrococcus luteus y se incubó a 37° C. por 24 horas.

7.3.5 Colocación de los discos conteniendo los estándares y la muestra (según la recomendación de COGUANOR)

Se impregnaron con una micropipeta 80 ul de las soluciones estándar en los discos de papel filtro para la curva patrón y se colocaron en las placas de petri, y en las placas para la muestra se colocaron en forma alterna dos discos con la solución estándar de referencia (4 mcg/ml para Bacillus subtilis y 1 mcg/ml para Micrococcus luteus) y dos discos con la preparación de la muestra de ensayo (Figura 2). Se incubaron las cajas inoculadas con Bacillus subtilis a 37° C por 24 horas y las inoculadas con Micrococcus luteus a 32-35° por 24 horas (3, 7). Se prepararon placas de petri en triplicado para cada concentración de estándar y cuadruplicado para la muestra (Figura 2).

7.4. Cálculos

7.4.1 Curva estándar:

Se obtuvieron 12 zonas de inhibición por cada uno de los diferentes estándares y se midieron los diámetros de las zonas de inhibición de cada una de las diluciones de trabajo utilizando un vernier, luego se calcularon los promedios de las lecturas obtenidas, donde:

Xa	=	Promedio de las lecturas del estándar 1
Xb	=	Promedio de las lecturas del estándar 2
Xc	=	Promedio de las lecturas del estándar 3
Xd	=	Promedio de las lecturas del estándar 4
Xe	=	Promedio de las lecturas del estándar 5

Luego se determinaron los puntos máximo y mínimo para la mejor curva.

$$\text{Punto mínimo} = 3Xa + 2Xb + Xc - Xe / 5$$

$$\text{Punto máximo} = 3Xe + 2Xd + Xc - Xa / 5$$

Se construyó la curva en papel semilogarítmico con los puntos máximo y mínimo correspondientes a la menor y mayor concentración de los estándares. Se colocó en la Y (ordenada) la concentración en mcg/ml y sobre la X (abcisa) el diámetro en mm de cada una de las concentraciones de los estándares.

#### 7.4.2. Concentración de la muestra:

Se obtuvieron 8 zonas de inhibición de la muestra, alternándose con 8 zonas del estándar medio correspondiente a cada uno de los microorganismos, 4.0 mcg/ml para Bacillus subtilis y 1.0 mcg/ml para Micrococcus luteus (Tabla 3, Figura 2).

Se promediaron las zonas de inhibición de la muestra ( $X_m$ ) y de la solución de referencia presentes en las mismas cajas de petri ( $X_{rm}$ ).

La muestra se corrigió ( $X_{cm}$ ) sumando o restando el factor de corrección ( $F_c$ ), obtenido de la resta de los promedios del estándar medio de la curva y del corrido con la muestra.

$$(X_c - X_{rm}) = +/- F_c$$

$$X_{cm} = X_m +/- F_c$$

El cálculo de la cantidad de eritromicina presente en la muestra se efectuó de la siguiente manera:

Se buscó en la curva estándar la concentración de la muestra correspondiente al valor corregido de la misma. Se multiplicó por 100 y se dividió dentro de la concentración del estándar de referencia (1.0 mcg/ml) para Micrococcus luteus y (4 mcg/ml) para Bacillus subtilis; obteniéndose así el porcentaje de eritromicina con el cual se puede calcular la potencia real en la muestra (Tablas 5-10, Gráfica 3-5).

#### 7.5. Diseño de la investigación

La investigación se basó en la comparación de la potencia antibiótica de la eritromicina por el método de Difusión en Agar, utilizando Micrococcus luteus (ATCC 9341) y Bacillus subtilis (ATCC 6633) como microorganismos indicadores de halos de inhibición.

Se utilizaron como pruebas estadísticas las siguientes: Método de la t pareada (en base a diferencias) (Tabla 11,12) y Gráfica de barras paralelas (40, 41) (Gráficas 1, 2).

**RESULTADOS**

Se utilizó el método de Difusión en agar, el cual emplea Micrococcus luteus (ATCC 9341) como microorganismo oficial designado por COGUANOR (Leyes Guatemaltecas Obligatorias) y se usó Bacillus subtilis (ATCC 6633) como microorganismo de prueba bajo las mismas condiciones. Se analizaron 35 muestras de eritromicina provenientes de una misma casa farmacéutica, de las cuales 22 indicaban la presentación de 500 miligramos por tableta (mg/tab), 6 de 250 mg/5ml, 3 de 105.0 mg/g, 1 de 250.0 mg/tab, 2 de 64/mg/g y 1 de 100 mg/ml, utilizando ambos microorganismos.

Todas las etiquetas de eritromicina no importando la concentración declarada en la etiqueta fueron llevadas a una concentración final de 1 mg/ml.

Se prepararon los estándares de trabajo utilizando el estándar 3 (diámetro de 22 para Bacillus subtilis y 23 para Micrococcus luteus como parámetro de comparación con la muestra.

Los estándares para Bacillus subtilis presentaron mayor uniformidad en las lecturas de halos producidos, siendo para el estándar 1 un diámetro promedio de 18 mm, estándar 2 de 20 mm, estándar 3 de 22 mm, estándar 4 de 24 mm y estándar 5 de 26 mm.

En cuanto a los estándares de Micrococcus luteus presentaron un diámetro un poco mayor obteniéndose un diámetro promedio para el estándar 1 de 19 mm, estándar 2 de 21 mm, estándar 3 de 23 mm, estándar 4 de 25 mm, y estándar 5 de 27 mm.

Con la presentación de 250 mg/5 ml fue necesario repetir los estándares y por consiguiente la muestra, debido a que los halos de inhibición no estaban bien definidos atrasando con ello el trabajo.

En la presentación de 105.00 mg/gramo, se pudo observar que la concentración obtenida con el microorganismo Bacillus subtilis ATCC 6633 fue más grande que con Micrococcus luteus (Tabla 7).

Existió mayor uniformidad en los resultados obtenidos con ambos microorganismos en 22 muestras de las 35 trabajadas equivalentes a un 63 por ciento de la presentación en gránulos con la potencia teórica de 500 mg/tab. (Tabla 5).

Con el microorganismo Bacillus subtilis en el 100 por ciento de las muestras trabajadas, se obtuvieron halos de inhibición mas claros, mayor delimitación en los mismos y una difusión uniforme del agente antimicrobiano.

La inoculación de los discos impregnados con eritromicina se llevó a cabo según las recomendaciones de COGUANOR y Farmacopea Americana.

Fue posible la reutilización de las cajas de petri en ambos ensayos, únicamente que sin mezclar las de Bacillus subtilis con las de Micrococcus luteus utilizándose en más ocasiones las trabajadas con Bacillus subtilis, ya que presentaron menor contaminación bacteriana.

El costo final por muestra fue de Q46.45 pero se redujo a Q28.24, debido a que algunos materiales (cajas de petri y metanol) fueron reutilizados. Los costos del análisis de eritromicina consignados en este estudio están sujetos a variaciones futuras, de acuerdo a los índices de inflación.

Se utilizaron como pruebas estadísticas Gráfica de Barras paralelas y el Método de la T pareada. (40, 41) (Gráfica 1, 2, Tabla 11, 12).

## DISCUSION DE RESULTADOS

Respecto al método utilizado para determinar la potencia antibiótica de eritromicina con el microorganismo oficial Micrococcus luteus ATCC 9341, se pudo comprobar que en el 100 por ciento de las muestras trabajadas se obtuvo resultados similares con el microorganismo de prueba Bacillus subtilis ATCC 6633.

Las muestras analizadas fueron tomadas al azar de los distintos lotes de producción, correspondiendo el mayor número (63 por ciento, Tabla 5) a la presentación de 500 mg/tabla., debido a que en el tiempo de realización del trabajo esta presentación fue la más elaborada por dicha casa farmacéutica.

Con la presentación de eritromicina igual a 250 mg/5 ml se efectuó el número más grande de repeticiones debido probablemente a una mala preparación de la suspensión introduciendo error al agregar el agua destilada necesaria (se toma como base el límite superior de la etiqueta para medir el volumen requerido de agua).

Para efectuar dichas repeticiones se tomaron nuevas muestras correspondientes al mismo lote de producción, volviéndose a preparar la suspensión indicada, obteniéndose en esta lecturas adecuadas.

Micrococcus luteus y Bacillus subtilis presentaron casi siempre un mismo crecimiento sobre el medio de agar al enfrentarlos con el antibiótico (eritromicina). Sin embargo, la presentación de la muestra de 105.0 mg/g no fue así, ya que se observaron halos de inhibición más grandes con Bacillus subtilis, lo que dio una concentración de eritromicina mayor. Esto es debido a la naturaleza propia de los microorganismos, los cuales en un momento dado pueden ser influenciados por la temperatura y humedad.

Se observó una mayor contaminación bacteriana en las cajas de petri trabajadas con Micrococcus luteus debido probablemente a que el medio antibiótico No. 11 que es el indicado para el crecimiento óptimo del microorganismo es más enriquecido (contenido de carbohidratos y azúcares), que el medio antibiótico No. 5 utilizado para Bacillus Subtilis (Tabla 4).

Fue posible la reutilización de las cajas de petri de 5 a 6 veces con Bacillus subtilis y de 2 a 3 veces con Micrococcus luteus, debido a que este último presentó más rápidamente contaminación

bacteriana en las cajas teniendo que ser descartadas.

Se rebajaron los costos en la determinación antibiótica de eritromicina gracias a la reutilización de las cajas de petri y a la recuperación de metanol por destilación.

10. CONCLUSIONES

1. No existe diferencia significativa entre el uso de Micrococcus luteus y Bacillus subtilis en la determinación de la potencia antibiótica de la eritromicina por el método de difusión en Agar con discos de papel filtro de 1/2 pulgada de diámetro.
  
2. Se comprobó que todas las muestras analizadas de eritromicina se encuentran dentro del rango de potencia antibiótica exigido por COGUANOR.
  
3. Es posible reutilizar las cajas de petri en mayor número las trabajadas con Bacillus subtilis.
3. El trabajar con el microorganismo Bacillus subtilis economiza tiempo y dinero.
  
4. Debe de efectuarse una revisión de la norma de COGUANOR NGO 6042 hl. sobre el microorganismo utilizado para la determinación de potencia antibiótica de eritromicina.

**RECOMENDACIONES**

- Preparar el estándar con sus respectivas diluciones cada vez que se realice la potencia antibiótica de eritromicina, por cualquier método utilizado.
- Evitar el retraso de la incubación una vez realizada con inoculación y colocación de discos, porque se presentaría una pre-difusión antes de haber obtenido el crecimiento óptimo.
- Utilizar las mismas cajas de petri (desechables) en varios análisis de potencia (se procede a descartar con una espátula las dos capas de agar) para bajar costos.
- Efectuar la recuperación del metanol a través del método de destilación.
- Sugerir a COGUANOR (Leyes Guatemaltecas Obligatorias) que incluya Bacillus subtilis como un microorganismo alternativo para la determinación de potencia antibiótica de eritromicina.
- Investigar si se han efectuado estudios similares al presente sobre la utilización de otros microorganismos que no sea el designado por las leyes obligatorias, pero sí avalado por una farmacopea.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Craig CR. Farmacología Médica. México: Interamericana S.A., 1985 XV+1082p. (p. 630, 688-732, 1022-1023).
2. Drill VA. Farmacología Médica. México: La Prensa Médica Mexicana. 1974. VII+1633 p. (p. 1491-1533).
3. Abbott Laboratorios. Erytromicin. Review of its properties and clinical statu. Illinois USA 1989. 138 p. (. 102-104).
4. Buchanan RE at al. Determinative bacteriology. 8 ed. USA: Williams y Wilkins Company, 1975. 928 p. (p. 478-485, 529-551).
5. Brittain D. Erytromicin Clinics of North America. Vol. 71 (6). 1987. 2140 p. (p. 1147-1150).
6. Derrick CW, Reilly FM. Eritromicina, Lincomicina y Clindamicina, J. Ped. 1982; 78:59-63.
7. COGUANOR ed. Antibióticos. Determinación de potencia para Eritromicina. Método Microbiológico. Guatemala: Ministerio de Economía. Comisión Guatemalteca de Normas, Doc. Tec. NGO 6042 hl. 1985. 9 p. (p. 1-9).
8. The United States Pharmacopeia. 21 St revisión. Official from January 1, 1985. Rockvine Md: United States Pharmacopeial convertion. 1984. LVII+1683 p. (p. 391-392, 1160-1164).
9. Farmacopea Europea. Consejo de Europa. 2a. ed. Parte I. Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 1988. VIII-4P.
10. Chairman, AO, Remington's Pharmaceutical Sciences. Pennsylvania; Mack Company Easton, 1980. 1928 p. (p. 1132-1134).

11. Organización Mundial de la Salud. Comité de Expertos. Especificaciones para las preparaciones farmacéuticas. Ginebra: 26 informe. Serie de informes Técnicos, Doc. Tec. No. 614, 1976, 229 p. (p. 1-13, 16-23).
12. Organización Mundial de la Salud. Farmacopea Internacional. 39 ed. Vols 2, vol 1. Ginebra OMS. 1980. 238 p. (p. 155-165).
13. Organización Mundial de la Salud. Vigilancia Farmacológica Internacional. Función de los Centros Nacionales. Ginebra: Serie de Informes Técnicos, Doc. Tec, No. 498, 1972. 52 p. (p. 5-28).
14. Organización Mundial de la Salud. 28a. Asamblea Mundial de la Salud. Parte I Anexo 12. Sustancias profilácticas y terapéuticas. Prácticas adecuadas para la fabricación y la Inspección de la calidad de los medicamentos. Ginebra: Actas oficiales de la OMS, Doc. Tec. No. 1226, 1975, 125 p. (p. 88-94).
15. Organización Panamericana de la Salud. VII Seminario de Control de Drogas y Alimentos para Centro América y Panamá. Vols 2, vol 1. Guatemala: POS Doc. Tec. 172. 197 p. (p. 4-8).
16. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social ed. Reglamento para el control de Medicamentos, Estupefacientes Psicotrópicos y Productos de Tocador e Higiene Personal del Hogar y Establecimientos Farmacéuticos Doc. 31 ed Guatemala, Feb. 1985. 53 p. (p. 47-48).
17. Pelcazar Jr. et. al. Microbiología. 2 ed. México: McGraw Hill. 1982. 862 p. (p. 65-86).
18. Organización Mundial de la Salud. Uso indebido de Antibióticos. Boletín Epidemiológico No. 6 vol. 3. Ginebra: OPS Doc. Tec. 1982. 116 p. (p.9-10).
19. Hugo WB. ed. Microbiology. Inhibition and destruction of the Microbial cell. London, Academic Press, 1971. XIII+819 p (p. 210, 372, 451-459).

20. Code of Federal Regulations; Food and Drugs. 21 CFR, 300. 50. Washington: U.S.A.; Government Printing Office, 1984. IX+891 p. (p. 247-261).
21. Goodman GA et al. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. 7 ed. Buenos Aires, Argentina: Panamericana. 1986, 1725 p. (p. 1129-1132).
22. Gribble MJ, Choww AW. Erythromycin; Symposium on Antimicrobial Therapy. Med Clin Am Nut 1982; 66:79-87.
23. Wasington II JA & Wilson WR. Erythromycin: Antimicrobial and Clinical perspective after 30 years of clinical use. Sub Rew May Clin Proc 1985; 60:189-203, 271-278).
24. Koch-Weser J. Bioavalability of Drugs. Nengl J. Med. 1974; 233-237. 503-506.
25. Caldwell Jr. Cluff LB. Adverse reactions to antimicrobial I agent. JAMA 1974; 230:77-80.
26. Wilson WR, Cockerill II FR. Tetracyclines, Chloramfenicol, Erythromicin and Clindamycin. May Clin Proc 1983; 58:92-98.
27. Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 6 ed. Buenos Aires, Argetina: El Ateneo. 1980. 1953 p. (p. 1502-1514, 1617-1623).
28. Gustafsson LL, Wide K. Marketing of obsolete antibiotics in Centro America. Lancet 1981; I:31-33.
29. Kaplan Lawrence A. Química Clínica. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana, 1983. 1793 p. (p. 78-84).
30. Meyer FH, Jawetz E. Goldflen A. Manual de Farmacología Clínica. Anguiano GL. Trad. México: El Manual Moderno. 174. 784 p. (p. 562-563).
31. Smith H. Antibiotics in Clinical Practice. 3 ed. Maryland, USA: University Park Press. 1977. IX+413p. (p. 96-100).

32. Sneat PHA et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. USA: Williams y Wilkins Company. Vol. 2, 1984. 1599 p. (p. 1104-1139, 1217).
33. Henry J. et al. Plasma and Salivary concentrations of erythromycin after administration of three different formulations. Postgraduate Med J 1980; 55:707-710.
34. Disanto AR, Chodos DJ. Influence of Study Design In Assessing Food Effects on Absorption of Erythromycin Base and Erythromycin Stearate. Antimicrobial Agents Chemoter. 1981; 20:190-196.
35. Straughan JL, Anderson R. Erythromycin - Three Decades Later. SA Med J 1983; 64:127-200.
36. Kavanagh Frederick ed. Analytical Academic Press, 1963, XVI+707 p. (p. 227, 10-14, 16-18, 289).
37. McCracken GH et al. Pharmacologic Evaluation of Orally Administered Antibiotics in Infants Children: Effect of Feeding on Bioavailability. Ped 1978; 62:738-743.
38. Kirsop BE, ed. Maintenance of Microorganisms: A Manual of Laboratory Methods, Edited by BE Kirsop and J.J.S. Shell. Orlando: Academic Press. 1984. X+207p. (p.41-45).
39. Bailey-Scott. Diagnóstico microbiológico. 6 ed. México: Médica Panamericana, 1983. 670 p. (p. 151-157).
40. Wayne W. Daniel. Bioestadística. México: Limusa, 1987. 666 p. (p. 186 - 198).
41. Kreyszig Erwin. Introducción a la Estadística Matemática, 8 ed. México: Limusa, 1985. 505 p. (p. 97-102).

Tabla No. 1	Página 33
Tabla No. 2	Página 36
Tabla No. 3	Página 37
Tabla No. 4	Página 38
Tabla No. 5	Página 40
Tabla No. 6	Página 42
Tabla No. 7	Página 42
Tabla No. 8	Página 43
Tabla No. 9	Página 44
Tabla No. 10	Página 45
Tabla No. 11	Página 46
Tabla No. 12	Página 47
Figura No. 1	Página 48
Figura No. 2	Página 49
Gráfica No. 1	Página 50
Gráfica No. 2	Página 51
Gráfica No. 3	Página 52
Gráfica No. 4	Página 53
Gráfica No. 5	Página 54

Tabla No. 1

Aplicación clínica de la eritromicina

MICROORGANISMO	SENSIBILIDAD
COCOS GRAM POSITIVO (Aerobios)	
- <u>Staphylococcus aureus</u>	Cerca del 10% resistentes
- <u>Staphylococcus epidermides</u>	Cerca del 40% resistentes
- Streptococcus grupo A	Rara vez resistente
- Streptococcus grupo B	Rara vez resistente
- Streptococcus grupo C	Rara vez resistente
- Streptococcus grupo D	50% enterococcus resistente
- Streptococcus grupo G	Rara vez resistente
- <u>Streptococcus pneumoniae</u>	Rara vez resistente
- <u>Streptococcus viridans</u>	Cerca del 10% resistente.
COCOS GRAM POSITIVO (Anaerobios)	
- <u>Peptococcus</u> sp.	Cerca del 20% resistente
- <u>Peptostreptococcus</u> sp	Cerca del 20% resistente
BACILOS GRAM POSITIVO (Aerobios)	
- <u>Bacillus anthracis</u>	Efectivo
- <u>Corynebacterium diphtheriae</u>	Droga de elección
- <u>Corynebacterium minutissimum</u>	Droga de elección

- Erysipelothrix musioopathiae Droga de elección
- Listeria monocytogenes Efectivo
- Nocardia sp Variable

BACILOS GRAM POSITIVO (Anaerobios)

- Actinomyces israeli Efectivo
- Clostridium perfringens Cerca del 25% resistente
- Clostridium tetani Efectivo
- Eubacterium sp Variable
- Lactobacillus sp Cerca del 10% resistente
- Propionibacterium acnes Cerca del 10% resistente

COCOS GRAM NEGATIVO (Aerobios)

- Branhamella catarrhalis Efectivo
- Neisseria gonorrhoeae Variable
- Nesseria meningitidis Efectivo

COCOS GRAM NEGATIVOS (Anaerobios)

- Veillonella sp Cerca del 10% resistente

BACILOS GRAM NEGATIVO (Aerobios)

- Bordetella pertussis Droga de Elección
- Brucella sp Variable
- Calymatobacterium granulomatis Efectivo

- Haemophilus ducreyi Droga de elección
- Haemophilus influenza Cerca del 40% resistente
- Legionella sp Droga de elección

#### BACILOS GRAM NEGATIVOS (Anaerobios)

- Bacteroides fragilis Cerca de 35% resistente
- Bacteroides melaninogenicus Droga de elección
- Campylobacter fetus Cerca de 35% resistente
- Eikenella corrodens Cerca de 20% resistente

#### ESPIROQUETAS

- Borrelia burgdorferi Variable
- Treponema pallidum Efectiva

#### OTRAS BACTERIAS

- Chlamydia trachomatis Efectiva
- Mycobacterium sp Variable
- Mycoplasma pneumoniae Droga de elección
- Rickettsia sp Variable
- Ureaplasma urealyticum Droga de elección

---

Referencia: Brittain D. Erytromicin clinics of North America  
Vol. 7 (6). 1987. 214 p. (p.1147-1150).

Tabla No. 2

## PREPARADOS DE LOS MACROLIDOS

PREPARADO	COMPOSICION	CARACTERES	FORMA FARMACEUTICA COMERCIAL
Eritromicina base	Contiene no menos del 85% de la droga	Cristales o polvo blanco ligeramente amarillento, inodoro y de sabor amargo. Muy poco soluble en agua, soluble en alcohol	Tabletas con capa entérica de 250 mg.
Estearato de eritromicina	Contiene 50% de eritromicina base	Polvos cristalinos blancos, inodoros y prácticamente insolubles en agua. Solubles en alcohol	Tabletas de 250 mg y 500 mg eritromicina base.
Estolato de eritromicina (propionil-lauril sulfato de eritromicina.		Idem	Cápsulas de 250 mg. Tabletas de 500 mg. Suspensión de 125 y 250 mg/ml.
Etil-succinato de	Contiene 76.5% de eritromicina base	Idem	Suspensión acuosa de 250 y 400 mg/5ml. Tabletas masticables de 200 mg (base). Ampollas de 1 ml conteniendo 100 mg expresado en base (solución en polietilén-glicol para administración intramuscular.
Lactobionato de eritromicina	Contiene 60% de eritromicina base	Cristales o polvo blanco ligeramente amarillento de olor débil, soluble en agua y alcohol.	Ampolla de 1 mg (base) para disolver en agua (vía intravenosa).
Fosfato de oleandomicina	Contiene 75.5% de oleandomicina base	Polvo cristalino blanco, inodoro, sabor amargo, soluble en agua y alcohol.	Tabletas de 250 y 375 mg. Jarabe 125 mg/5 ml. Ampolla de 500 mg (intravenosa).

Referencia: Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. 6 ed. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo. 1980. 1953 p. (p1502-1514, 1617-1623).

Tabla No. 3

**DILUCIONES DE LOS ESTANDARES PARA  
MICROCOCCUS LUTEUS Y BACILLUS SUBTILIS  
Y HALOS DE INHIBICION OBSERVADOS EN CADA UNO**

ESTANDAR	MICROCOCCUS LUTEUS (7.8)		BACILLUS SUBTILIS (3.9)	
	mcg/ml	mm	mcg/ml	mm
S <sub>1</sub>	0.25	19	1	18
S <sub>2</sub>	0.5	21	2	20
S <sub>3</sub>	1.0	23	4	22
S <sub>4</sub>	2.0	25	8	24
S <sub>5</sub>	4.0	27	16	25

- Referencia:
- Abbot Laboratories. Erytromicyn. Review of its properties and clinical statu. Illinois, USA, 1989. 138 p. (p. 102-104).
  - COGUANOR ed. Antibióticos. Determinación de potencia para Eritromicina. Método microbiológico. Guatemala. Ministerio de Economía. Comisión Guatemalteca de Normas, Doc. tec. U606042 hl. 1985. 9 p. (p. 1-9).

Tabla No. 4

PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Medio	Ingredientes	Gramos	MI
Inóculo para suspensión de Esporas	Triptona bacto	3.00 g	
	Extracto de res	3.00 g	
	Extracto de levadura	1.00 g	
	D-glucosa	1.00 g	
	Agua		1000 ml
Caldo de Esporulación	Peptona	1.00 g	
	Extracto de levadura	3.00 g	
	D-Glucosa	1.50 g	
	Cloruro de Manganeso	0.10 g	
	Agua		1000 ml
Medio Antibiótico No. 1	Extracto de carne	1.50 g	
	Extracto de levadura	3.00 g	
	Casitona	4.00 g	
	Peptona	6.00 g	
	Dextrosa	1.00 g	
	Agar	15.00 g	
	Agua		1000 ml
	pH	6.6 más menos 1	
Medio Antibiótico No. 5	Extracto de carne	1.50 g	
	Extracto de levadura	3.00 g	
	Peptona	6.00 g	
	Agar	15.00 g	
	Agua		1000 ml
		pH	7.9 más menos 1

Medio Antibiótico No. 11

Extracto de carne	1.50 g	
Extracto de levadura	3.00 g	
Casitona	4.00 g	
Peptona	6.00 g	
Dextrosa	1.00 g	
Agar	15.00 g	
Agua		1000 ml
pH	7.9 más menos 0.05	

---

Referencia: Farmacopea Europea. Consejo de Europa. 2a. ed. Parte I. Ministerio de Sanidad y Consumo. España. 1988 VIII-4P.

COGUANOR ed. Antibióticos. Determinación de potencia para eritromicina. Método Microbiológico para eritromicina. Guatemala: Ministerio de Economfa. Comisión Guatemalteca de Normas, Doc. Tec. UGO6042 hl. 1985. 9 p. (p. 1-9).

Tabla No. 5  
**POTENCIA Y PORCENTAJE ENCONTRADOS DE ERITROMICINA  
 EN GRANULOS Y EN SUSPENSION**

No. Muestra	MICROCOCCUS LUTEUS		BACILLUS SUBTILLIS	
	Potencia encontrada	%	Potencia encontrada	%
POTENCIA TEORICA 500 MG/TAB				
1	481.25	96.25	483.75	96.75
2	504.65	100.93	503.75	100.75
3	512.50	102.50	511.25	102.25
4	481.25	96.25	480.25	96.05
5	492.50	98.50	490.25	98.05
6	490.25	98.05	491.00	98.20
7	490.25	98.05	494.25	98.85
8	520.00	104.00	521.75	104.35
9	505.00	101.00	502.25	100.45
10	506.00	101.20	507.25	101.45
11	506.50	101.30	508.75	101.75
12	476.50	95.30	478.00	95.60
13	512.50	102.50	516.75	103.35
14	496.00	99.20	493.75	98.75
15	494.00	98.80	493.00	98.60
16	492.50	98.50	493.75	98.75
17	506.25	101.25	506.25	101.25
18	487.50	97.50	485.50	97.10
19	527.50	105.50	524.50	104.90
20	500.25	100.05	498.75	99.75
21	508.50	101.70	508.75	101.75
22	521.25	104.25	520.75	104.15

Tabla No. 6  
**POTENCIA Y PORCENTAJE ENCONTRADOS DE ERITROMICINA  
 EN GRANULOS Y EN SUSPENSION**

No. Muestra	MICROCOCCUS LUTEUS		BACILLUS SUBTILLIS	
	Potencia encontrada	%	Potencia encontrada	%
POTENCIA TEORICA 250 MG/5 ML				
23	246.25	98.75	240.00	96.00
24	251.25	100.50	255.00	102.00
25	268.75	107.50	246.25	98.50
26	253.75	101.50	102.25	255.62
27	240.63	96.25	237.50	95.00
28	247.50	99.00	250.00	100.00

Tabla No. 7  
**POTENCIA Y PORCENTAJE ENCONTRADOS DE ERITROMICINA  
 EN GRANULOS Y EN SUSPENSION**

No. Muestra	MICROCOCCUS LUTEUS		BACILLUS SUBTILLIS	
	Potencia encontrada	%	Potencia encontrada	%
POTENCIA TEORICA 105.00 MG/GRAMO				
29	102.90	98.00	110.25	105.00
30	105.53	100.50	108.15	103.00
31	103.95	99.00	105.00	100.00

Tabla No. 8  
**POTENCIA Y PORCENTAJE ENCONTRADOS DE ERITROMICINA  
 EN GRANULOS Y EN SUSPENSION**

No. Muestra	MICROCOCCUS LUTEUS		BACILLUS SUBTILLIS	
	Potencia encontrada	%	Potencia encontrada	%
POTENCIA TEORICA 250 MG/TABLETA				
32	250.50	101.00	251.75	100.70

Tabla No. 9  
**POTENCIA Y PORCENTAJE ENCONTRADOS DE ERITROMICINA  
 EN GRANULOS Y EN SUSPENSION**

MICROCOCCUS LUTEUS			BACILLUS SUBTILLIS		
No. Muestra	Potencia encontrada	%	Potencia encontrada	%	
POTENCIA TEORICA 64.00 MG/GRAMO					
33	63.68	99.50	63.87	99.80	
34	63.20	98.75	62.27	97.30	

Tabla No. 10  
POTENCIA Y PORCENTAJE ENCONTRADOS DE ERITROMICINA  
EN GRANULOS Y EN SUSPENSION

MICROCOCCUS LUTEUS			BACILLUS SUBTILLIS	
No. Muestra	Potencia encontrada	%	Potencia encontrada	%
POTENCIA TEORICA 100 MG/ML				
35	103.25	103.25	100.00	100.00

TABLA No. 11

METODO DE LA T PAREADA.

POTENCIA TEORICA 500 Mg./TABLETA

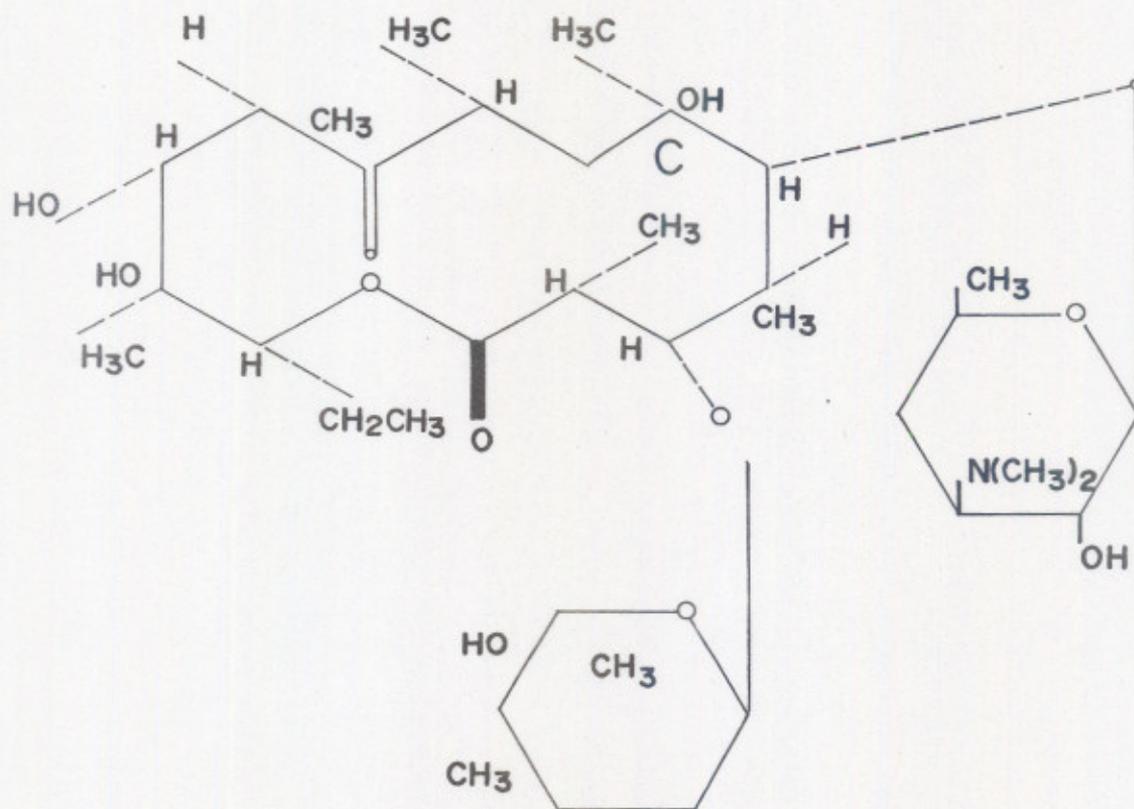
POTENCIA DE ERITROMICINA UTILIZANDO BACILLUS SUBTILIS POTENCIA TEORICA: 500 Mg. POR TABLETA.	POTENCIA DE ERITROMICINA UTILIZANDO MICROCOCCUS LUTEUS. POTENC. TEORICA: 500 Mg./TABLETA.	DIFERENCIA.
483.75	481.25	2.50
503.75	504.65	-0.90
511.25	512.50	-1.25
480.25	481.25	-1.00
490.25	492.50	-2.25
491.00	490.25	0.75
494.25	490.25	4.00
521.75	520.00	1.75
502.25	505.00	-2.75
507.25	506.00	1.25
508.75	506.50	2.25
478.00	476.50	1.50
516.75	512.50	4.25
493.75	496.00	-2.25
493.00	494.00	-1.00
493.75	492.50	1.25
506.25	506.25	0.00
485.50	487.50	-2.00
524.50	527.50	-3.00
498.75	500.25	-1.50
508.75	508.50	0.25
520.75	521.25	-0.50
MEDIA		0.06
DESVIACION STANDARD		2.04
T PAREADA		0.14

TABLA No. 12  
 METODO DE LA T PAREADA  
 POTENCIA TEORICA: 250 Mg./ML.

POTENCIA DE ERTTROMICIN UTILIZANDO BACILLUS SUB POTENCIA TEORICA: 250 Mg./	POTENCIA DE ERTTROMICIN UTILIZANDO MICROCOCCU POTENCIA TEORICA:250 Mg./	DIFERENCIA.
246.25	240.00	6.25
251.25	255.00	-3.75
268.75	246.25	22.50
253.75	255.62	-1.87
240.63	237.50	3.13
247.50	250.00	-2.50
MEDIA. DESVIACION STANDARD.		3.96 8.99
T PAREADA		1.08

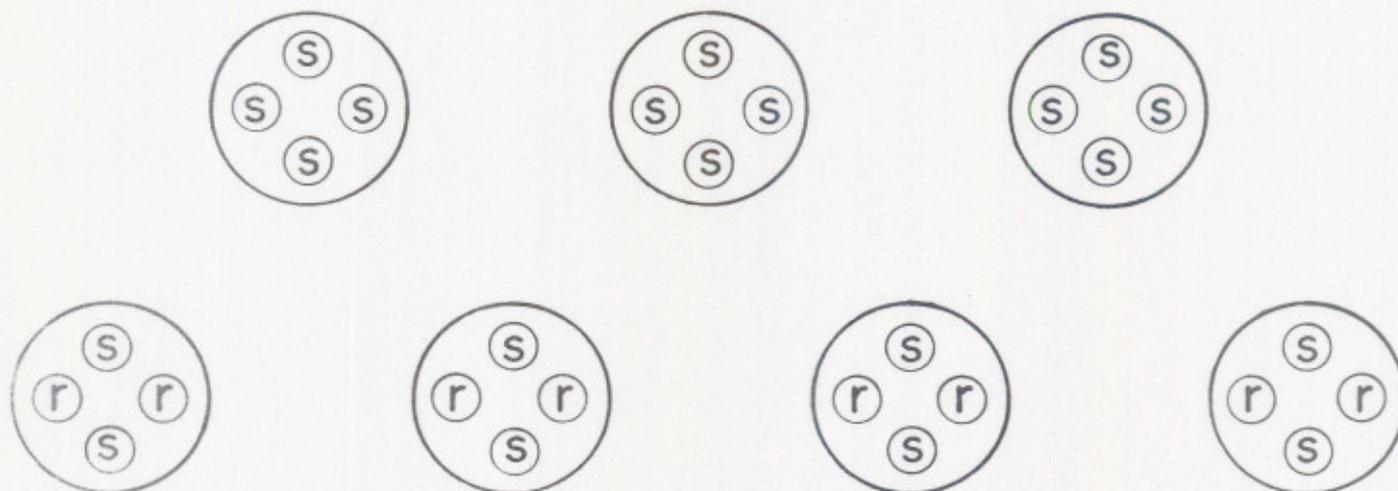
Figura No. 1

Fórmula química de la eritromicina



Referencia: The United States Pharmacopeia. 2d. st. revision. Official from January 1, 1985. Rockville Md: United States Pharmacopeial Convention, 1984. LVII+1683p. (p.391-392, 1160-1164).

Figura No. 2  
Colocación de los discos de papel filtro



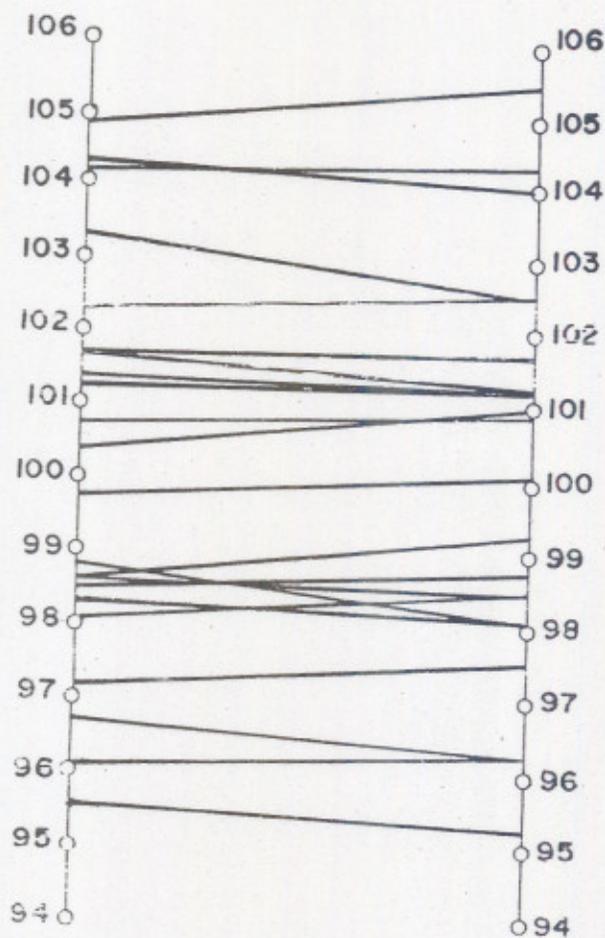
s: estandar

r: muestra

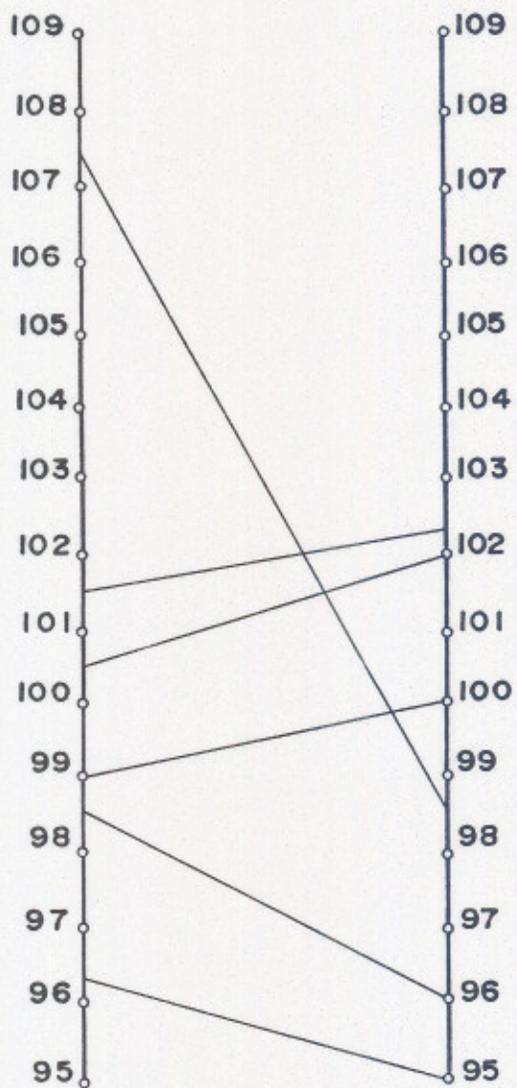
**Referencia:** COGUANOR ed. Antibióticos. Determinación de potencia para eritromicina. Método Microbiológico para eritromicina. Guatemala: Ministerio de Economía. Comisión Guatemalteca de Normas, Doc. Tec. NGO 6042 hl. 1985. 9 p. (p. 1-9).

Abbot Laboratorios. Erytromicyn. Review of its properties and clinical statu. Illinois, USA, 1989. 138 p. (p. 102-104).

Gráfica No. 1  
Barras paralelas  
Potencia antibiótica  
(500 mg/tab)



Gráfica No. 2  
Barras paralelas  
Potencia antibiótica  
(250 mg/5 ml)



Gráfica No.3

MODELO DE HOJA PARA LECTURA DE ESTANDARES  
Y MUESTRA PARA OBTENER LA POTENCIA ANTIBIOTICA

DETERMINACION DE POTENCIA DE ERITROMICINA

Microorganismo Utilizado: \_\_\_\_\_

Presentación: \_\_\_\_\_

Potencia Teórica: \_\_\_\_\_

Fecha de Análisis: \_\_\_\_\_

STANDARD				
	halos de inhibición (mm)			Prom.
St <sub>1</sub>				
St <sub>2</sub>				
St <sub>3</sub>				
St <sub>4</sub>				
St <sub>5</sub>				
MUESTRA				
	halos de inhibición (mm)			Prom.
ST				
M				

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

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

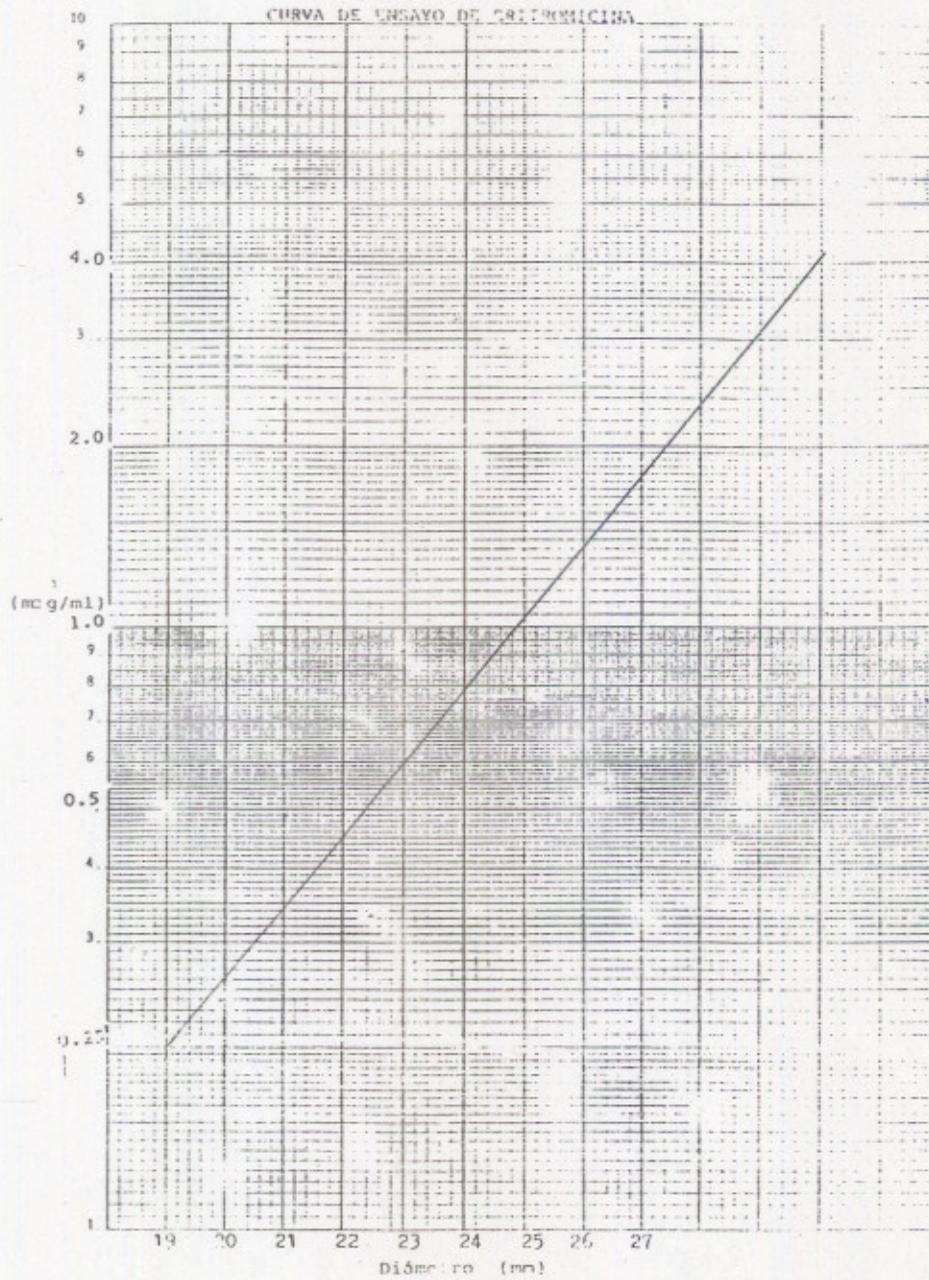
Factor de corrección: \_\_\_\_\_

Muestra corregida: \_\_\_\_\_

Potencia de la muestra: \_\_\_\_\_

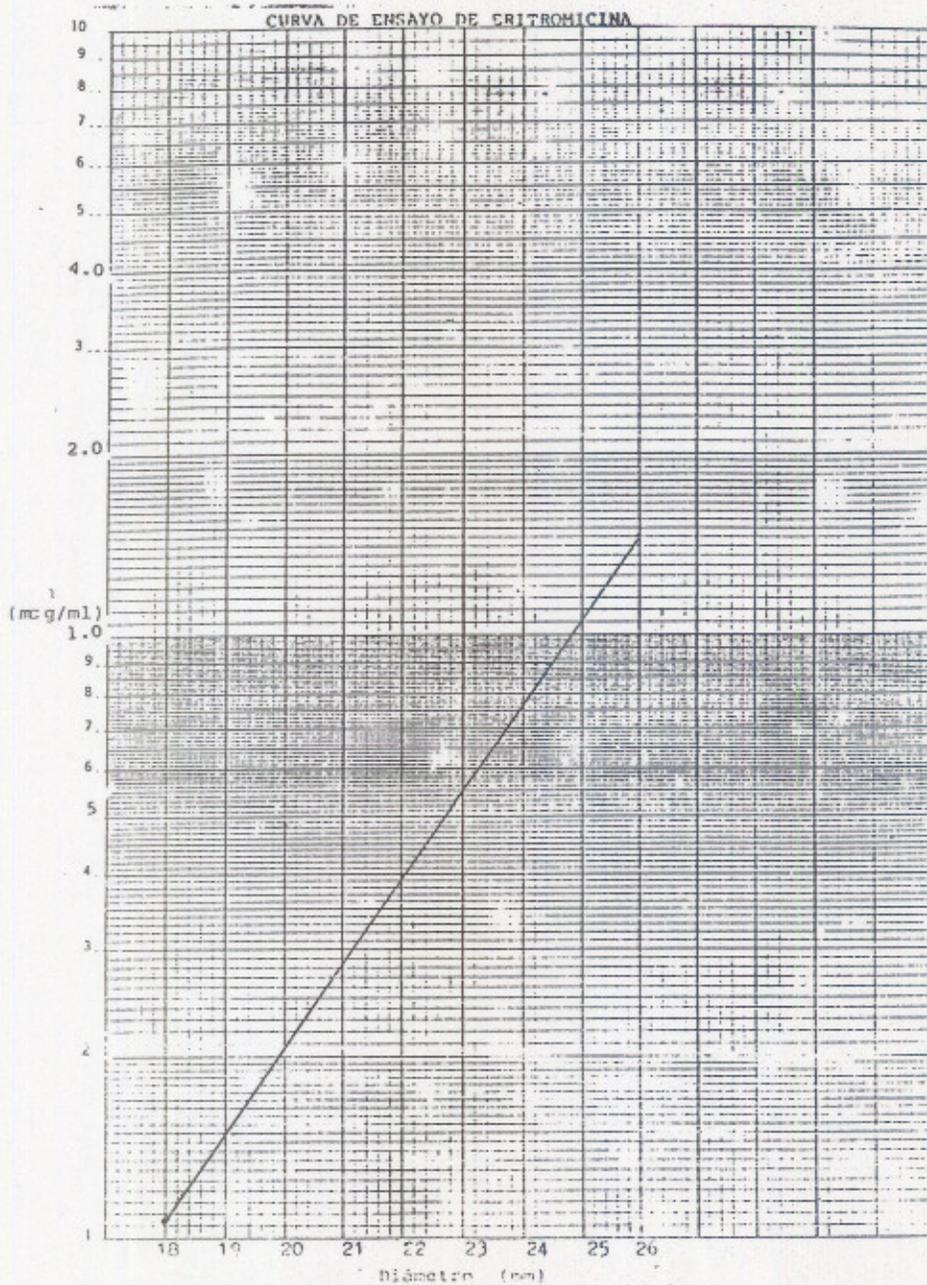
Porcentaje de la muestra: \_\_\_\_\_

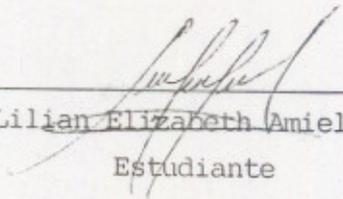
MODELO DE GRAFICA OBTENIDA CON MICROCOCCUS LUTEUS



Gráfica No.5

MODELO DE GRAFICA OBTENIDA CON BACILLUS SUBTILIS





---

Lilian Elizabeth Amiel R.

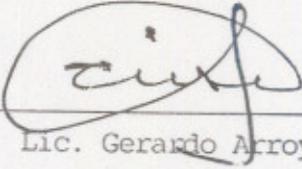
Estudiante



---

Lic. Sergio Iván Castillo C.

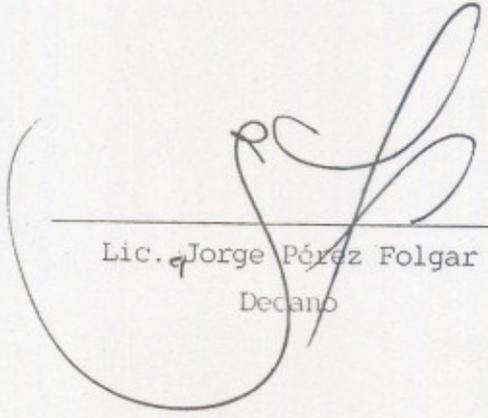
Asesor



---

Lic. Gerardo Arroyo

Director



---

Lic. Jorge Pérez Folgar

Decano

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central