



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**DESARROLLO DE UNA FORMULACION PARA UNA
SOLUCION OFTALMICA CON ACETONIDO DE
FLUOCINOLONA, SULFATO DE NEOMICINA Y
SULFATO DE POLIMIXINA B**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

FERNANDO PEREZ MOSCOZA

ASESOR; M, EN C, VICENTE ALONSO PEREZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. MEXICO

1995

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo

De tesis: Desarrollo de una formulación para una solución oftálmica con
Acetonido de Fluocinolona, Sulfato de Neomicina y Sulfato de
Polimixina B.

que presenta el pasante: Fernando Pérez Mecoza
con número de cuenta: 8958872 - 3 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 26 de Mayo de 199 5

PRESIDENTE	<u>M. en C. Vicente Alonso Pérez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Elizabeth Toriz García</u>	
SECRETARIO	<u>D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Guadalupe Rebollos Barrera</u>	
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Efrén Hernández Baltazar</u>	

*La gloria de Dios es la
inteligencia, o en otras palabras,
luz y verdad.*

D y C 93: 36

A Dios por permitirme alcanzar una de mis metas y por su infinito amor.

Con toda mi gratitud a mis padres Fernando y Yolanda, para quienes no tengo palabras con que agradecerles todo lo que han hecho por mi y decirles cuanto los quiero.

A mis hermanas Yolanda y Silvia por todo el amor y comprensión que me han brindado a lo largo de mi vida.

Al pequeño Ricardo, para quien la vida apenas comienza

Al M. en C. Vicente Alonso Pérez por sus consejos y por darme la oportunidad de iniciar mi carrera profesional dentro de la industria farmacéutica.

A la Q.F.B. Angélica García Guadarrama por su confianza y apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de Syntex por brindarme su amistad, especialmente al Q.F.B. Enrique Jimenez Orozco.

Al departamento de Control de Calidad de Syntex por las facilidades otorgadas, y de manera especial a Gisela Espinosa Moreno por su disposición y apoyo.

A mis profesores por compartir su sabiduría y conocimientos

A mis compañeros Yazmín, Juan Carlos, Joel, Olga, Julio, Norma, Marcela, Paulina, Eva y Octavio por todos los momentos que compartimos a lo largo de la carrera.

A mis amigos por brindarme su amistad, en especial a ti Isela por la amistad que nos une.

Sinceramente

Fernando

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS	1
I. - INTRODUCCIÓN	3
II. - GENERALIDADES	5
III. - OBJETIVOS	38
IV. - PARTE EXPERIMENTAL	39
V. - RESULTADOS	82
VI. - DISCUSIÓN DE RESULTADOS	109
VII. - CONCLUSIONES	117
VIII. - GLOSARIO	118
IX. - BIBLIOGRAFÍA	119

ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICAS Y TABLAS

FIGURAS:

No. 1	Composición anatómica del ojo	11
No. 2	Productos de degradación del Acetónido de Fluocinolona	32

GRÁFICAS

No. 1	Zona óptima de solubilización (Mezcla de polietilenglicol 400, propilenglicol y agua)	86
No. 2	Zona óptima de solubilización (Mezcla de propilenglicol y agua)	87
No. 3	Zona óptima de solubilización (Mezcla de polietilenglicol 400 y agua)	88
No. 4	Efecto del pH sobre la potencia del Acetónido de Fluocinolona (Nivel alto de sistema de solubilización y burbujeo de N ₂)	97
No. 5	Efecto del pH sobre la potencia del Acetónido de Fluocinolona (Nivel bajo de sistema de solubilización y burbujeo de N ₂)	98
No. 6	Zona de optimización para la formulación (Nivel alto de sistema de solubilización y burbujeo de N ₂)	99
No. 7	Zona de optimización para la formulación (Nivel bajo de sistema de solubilización y burbujeo de N ₂)	100

TABLAS:

No. 1	Resultados del diseño experimental para definir el sistema de cosolvenencia. Intensidad de formación de precipitado.	84
No. 2	Resultados del diseño experimental para definir el sistema de cosolvenencia. Intensidad de coloración de la solución.	85
No. 3	Resultados obtenidos de la matriz experimental para selección del agente tensoactivo.	91
No. 4	Resultados obtenidos de la matriz experimental para selección del agente antioxidante.	93
No. 5	Resultados del diseño central compuesto para optimización de la fórmula.	95
No. 6	Resultados del diseño central compuesto para optimización de la fórmula.	96
No. 7	Prueba de irritabilidad ocular para el lote A.	103
No. 8	Prueba de irritabilidad ocular para el lote B.	104
No. 9	Prueba de irritabilidad ocular para el lote C.	105
No. 10	Resultados de la estabilidad acelerada para el lote A.	106
No. 11	Resultados de la estabilidad acelerada para el lote B.	107
No. 12	Resultados de la estabilidad acelerada para el lote C.	108

I.- INTRODUCCIÓN.

Anteriormente el médico no contaba con una gama amplia de medicamentos para combatir los diferentes cuadros patológicos que afectan al ojo (blefarconjuntivitis, conjuntivitis angular, espiescleritis, úlcera marginal)(1). El uso de las sulfonamidas y antibióticos aplicados localmente en forma de suspensiones, soluciones o ungüentos ocupaba un lugar de primer orden entre los recursos terapéuticos con los que se contaba cuando las afecciones tenían un origen infeccioso y aún, cuando sin ser producidas por ninguna bacteria eran capaces de infectarse secundariamente(2).

Por otra parte, con el desarrollo de los corticoides se dió paso a una nueva área en el tratamiento médico. Se vió que existía la posibilidad de atacar ampliamente el factor antiinflamatorio de las afecciones oculares, independientemente de la etiología traumática, alérgica, irritativa o inclusive infecciosa de las mismas(2). Primeramente se trabajó la cortisona y la hidrocortisona que precedieron a otros corticoides, pero no se pudieron utilizar por periodos prolongados a causa de sus efectos colaterales, fué por ello que se tuvo la necesidad de sintetizar nuevos esteroides con un mayor efecto terapéutico y menores efectos indeseables, de ahí surgieron la prednisolona y metilprednisolona entre otros. Desde ese momento estos últimos fueron ampliamente utilizados pese a la retención de agua y sodio que causaban(1). Posteriormente la modificación química de la molécula corticosteroide, con el fin de obtener mejores efectos dió por resultado el Acetonido de Fluocinolona, compuesto capaz de tener una actividad antiinflamatoria máxima con una retención de sodio mínima(1).

Paralelamente a esta serie de acontecimientos, se observó que la disminución de la inflamación en un terreno infectado contribuye (en la mayoría de los casos) en una mejor utilización de los antibióticos locales, seguramente por un menor deterioro de los

tejidos. Además, de que la acción antiinflamatoria de los corticoides, puede traducirse en una ausencia de secuelas fibrosas y cicatrices post-inflamatorias(2).

La combinación de antibióticos y corticoides parecería ser un método de elección para tratar los procesos inflamatorio-infecciosos en el ojo. Trabajos realizados confirmaron plenamente esta sospecha y este tipo de preparados con dicha asociación se ha hecho muy popular en el tratamiento de las infecciones de la conjuntiva, córnea e iris(1) (2) (3).

Con lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo es el de desarrollar una formulación para una solución oftálmica, cuyos principios activos son:

Acetónido de Fluocinolona
Sulfato de Neomicina y
Sulfato de Polimixina B

la cual debido a la asociación antiinflamatorio-antibiótico que contempla, se espera sea de utilidad en algunos cuadros patológicos oculares como: conjuntivitis, inflamación, úlcera corneal y epiescleritis, y de esta forma contribuir con una opción más con la que el médico pueda contar para el tratamiento de dichos cuadros.

II.- GENERALIDADES.

II.1 Aspectos generales del desarrollo de formulaciones

Al inicio con el boticario y posteriormente con el químico, el farmacéutico se vió en la necesidad de encontrar y utilizar a los excipientes como componentes junto con sus principios activos en las formas farmacéuticas. Antaño, simplemente se pesaba la cantidad requerida del fármaco para posteriormente ser dispensado al paciente(4).

Con la introducción del excipiente farmacéutico, el cual puede ser definido como el o los componentes de una forma farmacéutica los cuales son física, química y biológicamente inertes, se llegó a las tabletas, cápsulas, soluciones y suspensiones(4).

A partir de ese momento comenzó el desarrollo de las diferentes formas farmacéuticas que actualmente se conocen, las cuales tienen como objetivo el facilitar la administración del fármaco y asegurar su estabilidad y biodisponibilidad.

Toda metodología práctica y eficiente para la formulación de cualquier medicamento debe integrar el conocimiento técnico y la insustituible experiencia acumulada, con herramientas estadísticas y administrativas que apoyen cada decisión, pero también se requerirá de una secuencia lógica de trabajo(5).

La metodología sistematizada propuesta a seguir para cada medicamento a desarrollar, consiste de los siguientes ocho pasos generales:

A) Revisión bibliográfica:

Antes de comenzar cualquier trabajo en el laboratorio debe realizarse una revisión exhaustiva de la literatura referente al ingrediente activo, al posible producto y proceso, a los métodos de evaluación y al objetivo terapéutico y de mercado a conseguir(5).

B) Preformulación:

Uno de los objetivos del conocimiento farmacéutico más importantes para conseguir calidad durante el desarrollo de un medicamento es el entendimiento profundo de las propiedades fisicoquímicas, farmacocinéticas y farmacodinámicas del ingrediente activo. Los estudios de preformulación son esenciales para este entendimiento pues, cuando se realizan en forma adecuada, colaboran para determinar el derivado o forma del fármaco y/o forma farmacéutica que debe ser seleccionada(5) (6).

c) Selección de la tecnología:

La selección de la tecnología a emplear en la fabricación futura del producto está íntimamente relacionada con la forma farmacéutica y por tanto no debe basarse sólo en las necesidades de mercadeo, sino además en la identificación de los recursos operativos disponibles(5).

D) Hipótesis generales:

Una hipótesis es una suposición de la que se infiere una consecuencia. En desarrollo de formulaciones se realizan un sin número de hipótesis, de las cuales son probablemente las más importantes las iniciales, es decir, las que relacionan los atributos del producto a conseguir con los recursos técnicos y científicos disponibles(5).

E) Experimentación con un número de variables reducido:

En el desarrollo de medicamentos se debe seguir una progresión de investigación científica estrictamente lógica, y no una serie de pasos guiados empíricamente por el formulador. El diseño y protocolo de trabajo, la reproducibilidad y el control estricto de cada experimento son fundamentales para desarrollar productos farmacéuticos de calidad. Al inicio de todo programa experimental es conveniente incluir un número grande de componentes-variables para asegurar que queden incluidas las que tienen mayor importancia. De este modo, por medio de un diseño experimental tamiz, se puede encontrar o partir de las variables candidatos, los

componentes más importantes y necesarios. En este aspecto, la utilidad de emplear diseños experimentales que nos indiquen que variables son las que realmente afectan a nuestro experimento es muy importante para poder minimizar su número, lo cual se verá reflejado en la disminución de tiempo y de materiales. Como ejemplos de este tipo de diseños experimentales podemos mencionar a los diseños tamiz (Plackett Burman y Diseños factoriales fraccionados) (5) (7) (8).

F) Optimización de la fórmula:

Al seleccionar los distintos excipientes, sus niveles y las etapas del proceso de manera racional, se ha obtenido un sistema satisfactorio desde el punto de vista cualitativo. El problema ahora es conocer qué tan cerca se encuentra dicho sistema de lo óptimo. Las propiedades obtenidas y el costo de manufactura de un producto cambia significativamente dependiendo de las proporciones de los ingredientes empleados. El problema a resolver al desarrollar una formulación es encontrar una composición dada que proporcione el mejor balance entre las propiedades del producto y el costo de manufactura. La utilización apropiada de técnicas de diseño experimental y optimización permiten conocer con mayor detalle el sistema en desarrollo y obtener, en algunos casos, medicamentos que tendrán características también satisfactorias, desde el punto de vista cuantitativo (5) (7).

Durante esta etapa, generalmente se fabrican lotes de regular tamaño, en los que varían los niveles de los excipientes dentro de rangos estrechos, con el fin de mejorar determinadas especificaciones cuantificables del producto y obtener un mayor conocimiento del valor de los factores que afectan su calidad. El diseño y análisis de los experimentos facilita, en gran medida, la obtención de dicho objetivo (5).

G) Escalamiento y caracterización del proceso:

Una vez optimizadas las concentraciones de los ingredientes esenciales de la fórmula, se procede a elaborar lotes piloto. Los objetivos básicos de los estudios piloto son:

- Comprobar que el método desarrollado en el laboratorio puede reproducirse a una escala de mayor tamaño.
- Descubrir operaciones que por diferentes razones sean inaplicables en la planta de fabricación.
- Simular, evidenciar y neutralizar posibles fallas y dificultades atribuibles al proceso o la fórmula.
- Adaptar la fórmula para su producción futura a gran escala.
- Caracterizar y "retar" al proceso para determinar los límites de tolerancia, dentro de los que se conserva la calidad del producto y dentro de los que se optimiza(5).

H) Transferencia de tecnología:

La transferencia de la tecnología es básicamente un proceso de comunicación en el que existe un emisor (el departamento de desarrollo) y un receptor (los departamentos de producción y control de calidad), cuyo éxito depende de lo bien estructurado que esté el mensaje y de la efectiva transmisión que se realice. Como en todo proceso de comunicación, la información que se transmite debe ser clara, concisa y suficiente para permitir el objetivo establecido(5).

II.2 Anatomía y Fisiología del ojo

El ojo humano debido a la distribución anatómica de los tejidos superficiales y a la permeabilidad de la córnea plantea un desafío para la administración tópica de fármacos(9). En la figura 1 se esquematiza la anatomía del ojo humano.

Las partes que forman al ojo son:

- a) Párpados.
- b) Globo ocular.
- c) Conjuntiva.
- d) Aparato lagrimal.
- e) Película precorneal.
- f) Córnea.

a) Párpados: que sirven para dar protección mecánica al globo y crear un medio óptimo para la córnea. Estos se mantienen lubricados y cargados de líquido gracias a las secreciones de las glándulas lagrimales y otras.

b) Globo ocular: cuya pared consiste en tres capas o túnicas concéntricas:

1. Una túnica fibrosa externa.
2. Una túnica vascular intermedia, la úvea o tracto uveal, que consiste en la coroides, el cuerpo ciliar y el iris.
3. Una túnica nerviosa, la retina.

Los huesos del cráneo se unen para formar una cavidad más o menos piramidal donde se aloja el globo ocular y esta cavidad se denomina órbita.

c) Conjuntiva: es la mucosa que reviste los párpados y se refleja sobre la parte anterior del globo ocular, está irrigada por gran cantidad de vasos sanguíneos y es rica en vasos linfáticos.

Los vasos sanguíneos se encuentran generalmente colapsados, sólo dilatados cuando se produce una irritación por un cuerpo extraño, una infección microbiana o por otras causas.

Los medicamentos que penetran en la conjuntiva pueden ser removidos por los fluidos hacia los sistemas sanguíneo y linfático. Con excepción de la córnea, la conjuntiva es la porción más expuesta del ojo.

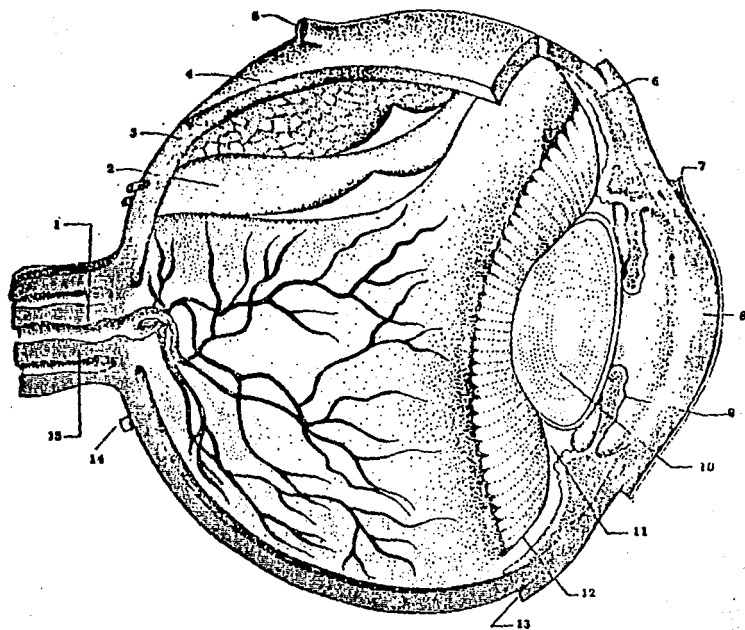
d) Aparato lagrimal: que se compone de la glándula lagrimal, los conductos lagrimales, el saco lagrimal y el conducto nasolagrimal.

Dentro de las características del líquido lagrimal tenemos que es un producto secretado por las glándulas lagrimales, contiene una enzima llamada lisozima que parece ser tiene una acción protectora contra organismos patógenos. El líquido es muy rico en proteínas totales, aproximadamente 0.70 % lo cual contribuye significativamente a las características amortiguantes ácido-base de las lágrimas, su pH es de 7.4 y es isotónico con una solución al 0.90 % de cloruro de sodio. Posee una densidad de 1.001 a 1.005 g/ml y un descenso crioscópico de 0.551 °C (10)(11)

En 1930 Riedley reportó la constitución química y las propiedades físicas del líquido lagrimal(10).

e) Película precorneal: la córnea debe estar mojada para que sea una superficie ópticamente adecuada; al secarse, pierde su brillo regular y su transparencia. La película precorneal, que es parte del líquido lagrimal provee esta importante superficie húmeda.

Esta película es compatible con preparados oftálmicos acuosos y lipídicos, consiste en una fina capa externa de lípido, una capa acuosa intermedia más gruesa y una fina capa mucóide interna. Con cada



- | | | |
|------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| 1.- Arterias de la retina | 2.- Retina | 3.- Coroides |
| 4.- Esclerótica | 5.- Vena | 6.- Coroides ciliar |
| 7.- Conjuntiva | 8.- Córnea | 9.- Iris |
| 10.- Cristalino | 11.- Zónula de Zinn | 12.- Plexos coroides |
| 13.- Inserción músculo recto | 14.- Arteria y nervios ciliares | 15.- Nervio óptico |

FIGURA No. 1
COMPOSICIÓN ANATÓMICA DEL OJO

parpadeo se renueva. Parece ser que no la afecta la adición de concentraciones de hasta el 2.00 % de cloruro de sodio al líquido conjuntival y la película se desorganiza a pH menor de 4.0 y mayor de 9.0(9).

f) Córnea: tiene un espesor de 0.50 a 1.00 mm, consiste en su mayor parte en las siguientes estructuras (de adelante hacia atrás):

1. Epitelio corneal.
2. Sustancia propia (estroma).
3. Endotelio corneal.

Representa la sexta parte anterior de la túnica externa del ojo, es muy delgada y avascular, las células epiteliales de su superficie contienen componentes lipoides, los cuales ayudan a la penetración de medicamentos liposolubles(10), está ricamente abastecida con nervios sensoriales, las terminaciones nerviosas libres corren entre las células epiteliales y la superficie.

Ninguno de los tejidos del cuerpo humano es tan sensible al dolor o al tacto como la córnea(9)(10).

Los fármacos administrados mediante instilación deben penetrar en el ojo y hacerlo principalmente a través de la córnea. La absorción corneal es mucho más eficaz que la escleral o la conjuntival. La base libre y la sal están en un equilibrio que depende del pH y de las características individuales del compuesto. Para contribuir a mantener la estabilidad y la solubilidad durante el almacenamiento, la medicación puede ser ácida en el momento de la instilación, pero la acción neutralizante del líquido lagrimal suele llevarla rápidamente al intervalo de pH lagrimal (pH 7.4 más o menos), en el cual habrá suficiente base libre como para iniciar la penetración del epitelio corneal(9).

Un vehículo con un pH o tonicidad excesivamente anormal producirá secreción, de esta manera se diluyen los fluidos en la cavidad inferior y ocasionalmente puede causar que el medicamento se derrame sobre el

párpado(10). También es importante mencionar que la penetración de fármacos en el ojo puede verse modificada cuando éste se encuentra enfermo(11).

II.3 Preparados oftálmicos

Los preparados oftálmicos son productos estériles prácticamente libres de partículas extrañas, debidamente acondicionados para instilar en el ojo. Los preparados oftálmicos comprenden:

1. Soluciones.
2. Suspensiones.
3. Ungüentos
4. Formas posológicas sólidas

La mayoría de las soluciones y suspensiones son acuosas. Los ungüentos oftálmicos suelen contener una base oleosa mineral de vaselina blanca. El hablar de las formas posológicas sólidas es hablar de los insertos oculares(9) (12).

Soluciones

"Son preparaciones estériles, libres de partículas extrañas, que contienen uno ó más fármacos activos disueltos en agua y cuya finalidad es la aplicación tópica en los ojos, estable química y biológicamente y no irritante a la córnea"(13).

Dentro de los requerimientos que debe cumplir una solución oftálmica son: esterilidad, ausencia de partículas extrañas, pH y tonicidad de la solución (óptimos en relación con el líquido lagrimal) y viscosidad adecuada. Por lo tanto, todo producto oftálmico deberá ser terapéuticamente activo, libre de microorganismos y partículas extrañas, estable química y biológicamente por un tiempo razonable, y no irritante para la córnea.

Requerimientos de una solución oftálmica:

- Claridad de las soluciones:

Es sumamente importante destacar que toda solución oftálmica debe ser clara y libre de partículas extrañas, por lo que se recomienda una filtración adecuada.

- Esterilidad:

Toda solución debe ser fabricada y acondicionada en forma estéril ya que la invasión de microorganismos en la córnea es fácil, más aún encontrándose el epitelio corneal intacto.

La United States Pharmacopeia y la British Pharmacopeia (14) (15), incluyen entre las especificaciones que deben cumplir las soluciones oftálmicas, la esterilidad.

La conjuntiva, a diferencia de otras mucosas, cuenta con un excelente sistema de drenaje, el cual, en muchos casos elimina rápidamente (a través del conducto nasolagrimal) los agentes infecciosos que se extienden por el ojo o que son transportados a los ojos por los dedos, pañuelos o gotas. El Staphylococcus aureus es el responsable en la mayoría de las infecciones en la conjuntiva. Un organismo muy dañino que crece en la córnea mejor que en cualquier otro medio conocido es la Pseudomona aeruginosa; este microorganismo en muchas ocasiones se ha encontrado como contaminante en soluciones para uso oftálmico (10).

Entre los agentes esterilizantes tenemos la filtración, la cual es empleada para producir esterilidad en ciertos productos, este proceso depende de la remoción física de microorganismos a través del medio filtrante o por un mecanismo de tamiz, es un método comúnmente usado para la esterilización de productos termolábiles como son los antibióticos o soluciones oleosas (16). La USP XX establece que la filtración con membrana estéril en condiciones asépticas es el método de esterilización preferible (9). La filtración con membrana ofrece la ventaja sustancial de trabajar a temperatura ambiente. Entre otros métodos de

esterilización esta el calor seco, el cual está condicionado al porcentaje de humedad relativa dentro de las cámaras. El óxido de etileno es empleado universalmente y una revisión de la literatura nos da una idea acerca de la diversificación de sus aplicaciones. Otro método que se utiliza para producir esterilidad es por medio de calor húmedo, sistema que es conocido como autoclave, pero la solución debe ser bastante termoresistente como para soportar el procedimiento. Dentro del proceso de esterilización es muy importante demostrar la eficiencia del mismo, razón por la cual en 1970 se implementó el uso de indicadores biológicos que certifican que el procedimiento se ha llevado correctamente(16). Se ha recomendado principalmente el uso de microorganismos del género Bacillus, utilizando una especie para un proceso determinado.

• pH:

A pesar de la capacidad de las lágrimas de neutralizar, tanto soluciones ácidas como básicas, llevándolas a términos confortables, la estabilización del pH dentro de los límites determinados de las soluciones oftálmicas, es una de las condiciones más importantes a tomarse en cuenta.

Se considera que las lágrimas llegan a neutralizar, llevando a los límites confortables instantáneamente, soluciones que van de pH 3.5 hasta 10.5(11). Si la posibilidad de neutralización de las lágrimas es sobrepasada, se lesiona la córnea, produciéndose la sensación de dolor. Por lo tanto, aquella solución oftálmica que corresponda aproximadamente al pH normal de la secreción lagrimal, será menos irritante. Un problema al que comúnmente se enfrenta, es el hecho de que al reducirse la acidez se destruye la estabilidad de la solución(17), por lo que, entonces es importante encontrar un equilibrio entre el pH de la solución y la capacidad amortiguadora del líquido lagrimal.

• Isotonicidad:

Por tonicidad se entiende la presión osmótica ejercida por las sales en solución acuosa. La solución

oftálmica es isotónica con otra solución cuando las magnitudes de las propiedades coligativas de ambas soluciones son iguales. Se considera que una solución oftálmica es isotónica cuando su tonicidad es igual a la de una solución de cloruro de sodio al 0.90 %. Anteriormente no existía mucho en el cálculo de la tonicidad. Al futuro farmacéutico se le enseñaban con grandes detalles los requisitos y los medios para obtener una tonicidad exacta, a veces en detrimento de otros factores como esterilidad y estabilidad(9). En la actualidad se sabe que el ojo tolera mucho más las variaciones de la tonicidad de lo que antes se creía. Por lo general, en efecto, tolera soluciones equivalentes a un intervalo de 0.60 al 2.00 % de cloruro de sodio(18).

Cuando es necesario hacer el ajuste de la tonicidad se puede hacer por medio de algunas propiedades generales de las soluciones:

1. Abatimiento del punto de congelación.
2. Presión osmótica.

A estas propiedades se les conoce con el nombre de propiedades coligativas o colectivas, debido a que se hayan confinadas a su origen común. Cada una de las propiedades sólo depende del número de moléculas de soluto presente, no del tamaño o masa molar de las moléculas(19).

1. Abatimiento del punto de congelación:

La ecuación que nos permite calcular el abatimiento del punto de congelación de una solución es la siguiente:

$$\Delta T = K_f m_2 \quad (1)$$

donde el símbolo K_f es la constante del descenso del punto de congelación y m_2 es la molalidad de la solución.

La depresión del punto de congelación para la sangre y el líquido lagrimal es de -0.52°C (10).

2. Presión osmótica:

La ecuación que nos permite calcular la presión osmótica de una solución es la siguiente:

$$\pi = M_2 RT \quad (2)$$

siendo la ecuación (2) la ecuación de Van't Hoff para la presión osmótica π (20).

Equivalente de cloruro de sodio: se utiliza para ajustar la tonicidad de las soluciones de productos farmacéuticos inyectables y oftálmicos. Se define como el peso en gramos de cloruro de sodio que produce el mismo efecto osmótico que un gramo de la sustancia en cuestión (22).

Con el correr de los años se ha investigado intensamente la tonicidad de las soluciones oftálmicas (así como de las parenterales) y estos estudios han conducido a la acumulación y publicación de gran cantidad de equivalentes de cloruro de sodio que son útiles para calcular los valores de la tonicidad.

Cuando se desea calcular el equivalente de NaCl para un medicamento no incluido en tablas, se puede hacer a partir de las propiedades coligativas que se acaban de mencionar con anterioridad.

Se pueden calcular los equivalentes de cloruro de sodio a partir de la presión osmótica. Retomando la ecuación (2) tenemos:

$$\pi = M_2 RT \quad (2)$$

en donde:

$$M_2 = n_2 / V \quad (3)$$

Si consideramos $V = 1 \text{ Lt}$ y que $n_2 = m/PM$, donde m es la masa y PM el peso molecular del soluto. Sustituyendo en la ecuación (3) obtenemos:

$$M_2 = \frac{m/PM}{l \text{ Lt}} \quad (4)$$

y

$$C_n = \frac{m}{l \text{ Lt}} = \frac{g}{\text{Lt}} \quad (5)$$

sustituyendo la ecuación (5) en (4) obtenemos:

$$M_2 = C_n/PM \quad (6)$$

sustituyendo (6) en (2) tenemos:

$$\eta = \frac{C_n RT}{PM} \quad (7)$$

siendo esta ecuación únicamente válida para fármacos que no se disocian. Para fármacos que se disocian hay que considerar el factor de disociación (i), quedando entonces la ecuación (7) de la siguiente manera:

$$\eta = \frac{C_n i RT}{PM} \quad (8)$$

En base al concepto de equivalente de NaCl

$$\eta_{\text{sust}} = \frac{1 \text{ g/Lt}}{PM_{\text{sust}}} i_{\text{sust}} RT \quad (9)$$

$$\eta_{\text{NaCl}} = \frac{E_{\text{NaCl}}}{PM_{\text{NaCl}}} i_{\text{NaCl}} RT \quad (10)$$

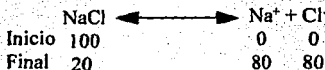
Igualando las ecuaciones (9) y (10) tenemos:

$$\frac{E_{\text{NaCl}}}{PM_{\text{NaCl}}} i_{\text{NaCl}} RT = \frac{1g/L1}{PM_{\text{sust}}} i_{\text{sust}} RT \quad (11)$$

despejando E_{NaCl} y eliminando los términos semejantes obtenemos:

$$E_{\text{NaCl}} = \frac{(i_{\text{sust}})(PM_{\text{NaCl}})}{(i_{\text{NaCl}})(PM_{\text{sust}})} \quad (12)$$

Se sabe que el cloruro de sodio se disocia en un 80 %, por lo que si consideramos lo siguiente:



el factor de disociación (i) se expresa de la siguiente manera:

$$i = \frac{\# \text{ Partículas finales}}{\# \text{ Partículas iniciales}} \quad (13)$$

calculando el factor de disociación para el NaCl tenemos $i = 180/100 = 1.8$. Susstituyendo este valor y su peso molecular el cual es de 58.5 la ecuación (12) se reduce a:

$$E_{\text{NaCl}} = \frac{(i_{\text{sust}})}{(PM_{\text{sust}})} \quad (14)$$

De esta manera se puede obtener los equivalentes de NaCl para cualquier fármaco.

También es posible calcular los equivalentes de NaCl para cualquier fármaco a partir de la depresión en el punto de congelación. Si retomamos la ecuación (1) que explica la depresión del punto de congelación tenemos:

$$\Delta T = K_f m_2 \quad (1)$$

donde m_2 es la concentración del soluto en molalidad, pero si consideramos que el disolvente es agua y su densidad de 1 g/mL, entonces se puede expresar en molaridad. Considerando lo anterior la ecuación (1) queda como sigue:

$$\Delta T = K_f M_2 \quad (15)$$

donde M_2 es la concentración del soluto en molaridad. Retomando la ecuación (6):

$$M_2 = Cn/PM \quad (6)$$

Se sabe que K_f tiene un valor de 1.8597 °K kg/mol para el agua, ya que esta constante sólo depende de las propiedades del disolvente puro (20), si sustituimos el valor de esta constante y la ecuación (6) en la ecuación (15) tenemos entonces:

$$\Delta T = 1.8597 Cn/PM \quad (16)$$

siendo esta ecuación únicamente válida para fármacos que no se disocian. Para fármacos que se disocian hay que considerar el factor de disociación (i), quedando entonces la ecuación (16) de la siguiente manera:

$$\Delta T = (1.8597 Cn/PM)(i) \quad (17)$$

si sabemos que:

$$(i)(1.8597) = L_{iso} \quad (18)$$

Sustituyendo la ecuación (18) en (17) obtenemos:

$$\Delta T = (L_{iso}) (Cn/PM) \quad (19)$$

En base al concepto de equivalentes de NaCl tenemos:

$$\Delta T_{sust} = \frac{lg/Lt}{PM_{sust}} (L_{iso}^{sust}) \quad (20)$$

$$\Delta T_{NaCl} = \frac{E_{NaCl}}{PM_{NaCl}} (L_{iso}^{NaCl}) \quad (21)$$

igualando las ecuaciones (20) y (21) tenemos:

$$\frac{lg/Lt}{PM_{sust}} (L_{iso}^{sust}) = \frac{E_{NaCl}}{PM_{NaCl}} (L_{iso}^{NaCl}) \quad (22)$$

Despejando E_{NaCl} de la ecuación (22) tenemos entonces:

$$E_{NaCl} = \frac{lg/Lt}{PM_{sust}} (L_{iso}^{sust}) \left(\frac{PM_{NaCl}}{L_{iso}^{NaCl}} \right) \quad (23)$$

sabemos que el factor de disociación para el NaCl es de 1.8, si sustituimos este valor en la ecuación (18) obtenemos el L_{iso} para el NaCl el cual es de 3.4. Su peso molecular el cual es de 58.5, sustituyendo ambos valores en la ecuación (23), ésta se reduce a:

$$E_{NaCl} = 17.2 (L_{iso}^{sust}) / PM_{sust} \quad (24)$$

De esta manera se puede obtener el equivalente de NaCl para cualquier fármaco.

• Viscosidad:

Cuando se tiene una solución oftálmica viscosa se reduce considerablemente la posibilidad de que sea eliminada por el lagrimeo excesivo, por lo que se aumenta el tiempo que está en contacto con la córnea pudiendo existir un mayor efecto terapéutico(10). La USP permite el uso de agentes viscosantes para prolongar el tiempo de contacto en el ojo. Las sustancias que se agregan a menudo para aumentar la viscosidad son metilcelulosa, alcohol polivinílico e hidroximetilcelulosa(12). En términos generales la viscosidad aumentada de 25 a 50 cps prolonga de manera significativa el tiempo de contacto en el ojo. Resultados obtenidos apuntan a estabilizarse más allá de los 50 centipoises, de modo que las viscosidades mayores no ofrecen ninguna ventaja importante y tienden a dejar un residuo perceptible en los bordes inferiores del ojo(9).

• Aditivos:

Aunque el uso de diversos aditivos en soluciones oftálmicas es permisible, no hay muchos para elegir. Deben de tener características de calidad microbiológica, aprotéica, de solubilidad y de pureza que ayuden a evitar problemas de estabilidad y de contaminación(16) (22).

Se permite el uso de agentes antioxidantes, en particular el bisulfito ó metabisulfito de sodio, el uso de agentes quelantes como sales de E.D.T.A. y ácido cítrico, esto con el fin de darle mayor estabilidad a la solución ya que la oxidación es una causa primordial de inestabilidad de los productos. Como ya se mencionó la oxidación puede inhibirse con antioxidantes llamados catalizadores negativos. Los sinergistas, que acentúan la actividad de los antioxidantes, suelen ser compuestos orgánicos que forman complejos con pequeñas cantidades de iones de metales pesados. El E.D.T.A. se ha empleado para estabilizar ácido ascórbico, oxitetraciclina, penicilina, adrenalina, isoproterenol y prednisona(23).

La oxidación muchas veces afecta a radicales libres y origina reacciones en cadena. Basta una muy pequeña

cantidad de oxígeno para iniciar una reacción en cadena, por lo que algunas veces es necesario eliminar el oxígeno(24). Algunos métodos para poder eliminar oxígeno son(25):

1. Burbujeo de un gas inerte (nitrógeno, dióxido de carbono).
2. Evacuación.
3. Catálisis

Al eliminar el oxígeno se contribuye a reducir a un mínimo el deterioro por oxidación.

En general, el antioxidante ideal tiene que ser estable y eficaz en un amplio intervalo de pH, soluble en su forma oxidada, incoloro, atóxico, no volátil, no irritante, eficaz en bajas concentraciones, termoestable, compatible con el sistema de recipiente y cierre, y con los componentes de la fórmula(9).

De entre los sistemas amortiguadores de pH permitidos para su uso en preparados oftálmicos tenemos las sales de citratos, acetatos, fosfatos y boratos. Lo ideal sería formular los preparados oftálmicos a un pH equivalente al del líquido lagrimal, que es de 7.4, pero es raro que se consiga esto, porque la gran mayoría de los componentes activos que se utilizan en oftalmología son sales de bases débiles, más estables a pH ácido.

En general, para hacer un ajuste óptimo del pH hay que transigir porque el pH elegido debe ser óptimo para mantener la estabilidad del producto. El sistema amortiguador que se elija debe tener suficiente capacidad para mantener el pH dentro de la gama estable mientras el producto permanezca almacenado. En esta situación la capacidad amortiguante es fundamental.

Se suele aceptar que un pH bajo (ácido) no causa necesariamente ardor ni malestar de por sí al hacer la instilación. Si después de la instilación el pH global de las lágrimas vuelve rápidamente a 7.4, el malestar es mínimo. En cambio, si la capacidad buffer es tan grande que se opone al ajuste por el líquido lagrimal y si el

pH en todo el ojo sigue siendo ácido por un tiempo apreciable, puede ocurrir ardor y malestar. Por consiguiente, la capacidad amortiguante debe ser adecuada para mantener la estabilidad pero lo menos posible para que el pH del líquido lagrimal sólo sea alterado en forma momentánea.

También es restringido de modo similar el uso de tensoactivos en los preparados oftálmicos. Los tensoactivos no iónicos, que son la clase menos tóxica de tales compuestos, se emplean en concentraciones bajas, en particular en suspensiones de esteroides y como coadyuvantes para conseguir la claridad de la solución. Las hormonas corticopararrenales (adrenocorticales) incluyendo cortisol, prednisolona y sus acetatos, acetato de cortisona y fluorometolona son solubilizadas por polisorbato 80 en soluciones oftálmicas(9). El empleo de tensoactivos, en particular en cualquier concentración importante, debe moderarse reconociendo las características de sorción de estos compuestos. En especial, los tensoactivos no iónicos pueden reaccionar mediante adsorción con los conservadores antimicrobianos e inactivar en gran parte el sistema de conservación.

Los agentes antimicrobianos son un grupo de agentes bacteriostáticos o fungistáticos adicionados a las preparaciones contenidas en recipientes para dosis múltiples. Estos se adicionan en una concentración adecuada, de tal forma que prevengan el crecimiento de microorganismos que se pueden introducir accidentalmente por algún mecanismo determinado. Existen concentraciones límites para emplearse en este tipo de preparaciones.

Puede ser bastante difícil elegir un conservador oftálmico, en parte por la cantidad relativamente pequeña de agentes apropiados. Por supuesto, no existe el conservador ideal y los siguientes criterios pueden ser útiles para elegirlos:

1. El agente debe tener un espectro amplio, ser activo frente a los microorganismos gram positivos y gram negativos y a los hongos. Además debe ejercer una acción bactericida rápida, en particular para microorganismos de comprobada virulencia como lo son las cepas de *Pseudomona aeruginosa*.
2. El agente debe ser estable en una amplia gama de condiciones, incluso temperaturas de esterilización y pH.
3. Que sea compatible con los demás componentes de la formulación y con el sistema de envasado.
4. Que no exista toxicidad e irritación en un margen de seguridad adecuado.

Además de la eficacia del conservador como medida inmediata, también se debe determinar si es adecuado o estable a medida que pasa el tiempo. A menudo esto se hace midiendo la estabilidad química y la eficacia conservadora a lo largo de un período dado y en condiciones diversas.

La elección de conservadores apropiados para uso oftálmico está asombrosamente limitada. Ejemplos de ellos tenemos:

- a) Compuestos de amonio cuaternario (Cloruro de benzalconio)
- b) Mercuriales orgánicos (Tiomersal)
- c) Alcoholes y fenoles sustituidos (Clorobutanol, alcohol polivinílico)

• Envases:

Los envases o recipientes son parte integral de una formulación de un producto oftálmico y pueden ser considerados como un componente de ésta.

El tradicional recipiente de vidrio oftálmico con su gotero de vidrio ha sido reemplazado casi por completo por el frasco gotero de polietileno de baja densidad. Sólo en casos muy contados todavía se emplean recipientes de vidrio, por lo general por limitaciones de estabilidad.

Los recipientes de plástico presentan desventajas considerables como son(26):

- a) Presentan permeabilidad a los vapores.
- b) Presentan permeabilidad a los componentes de la fórmula.
- c) No son transparentes como el vidrio.

Suspensiones oftálmicas

"Son dispersiones de fármacos relativamente insolubles y finamente divididos en un vehículo acuoso que contiene agentes suspensores y dispersantes apropiados. Entre otras cosas, el vehículo es una solución saturada del fármaco"(9).

En la práctica se aceptan con un tamaño de partícula de un 90.0 % menor de 10.0μ , un 99.0 % menor de 20.0μ y con ninguna partícula que supere los 50.0μ (11)(13). En estas formulaciones es importante el uso de polisorbatos, ya que los mismos favorecen la suspendibilidad de los principios activos(13).

Ungüentos oftálmicos

"Son ungüentos para aplicación en los ojos, en los que se debe considerar la esterilidad y el tamaño de partícula como condiciones fundamentales. No deben ser irritantes al ojo y deben cumplir con la prueba de fugas"(13).

La isotonía y el pH no deben tomarse en cuenta, ya que los ungüentos no presentan presión osmótica y la variación del pH es prácticamente imposible en productos insolubles.

Formas posológicas sólidas

El hablar de éstas es el hablar de insertos oculares y se remota a las laminillas de la Farmacopea Británica de la década de 1940. Estas obleas impregnadas de fármaco estaban destinadas a disolverse al insertarlas debajo del párpado. Todas ellas se caracterizaban por una actividad acentuada del fármaco; es decir, la curva de biodisponibilidad del fármaco instilado en solución acuosa aumentaba mucho en cuanto al pico de absorción y a la duración, pero también se acentuaban los efectos colaterales.

En épocas más recientes se han desarrollado insertos oculares en los que el fármaco se entrega sobre la base de mecanismos de difusión. Este dispositivo provee un fármaco oftálmico a velocidad constante conocida y así se reducen a un mínimo los efectos colaterales porque se evitan los picos de absorción excesivos.

II.4 Propiedades del Acetónido de Fluocinolona

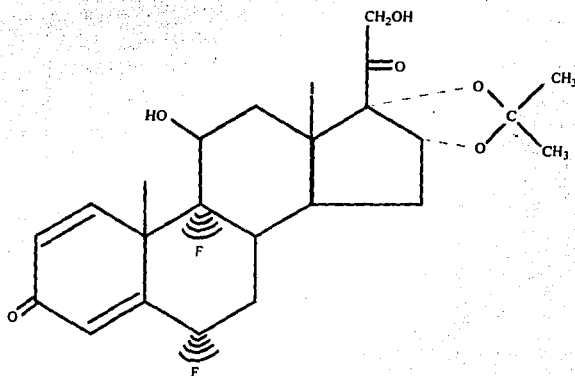
NOMBRE QUÍMICO:

16, 17 Acetónido de 6 alfa, 9 alfa - difluor - 11 beta, 16 alfa, 17, 21 - tetrahidroxipregna - 1, 4 - dieno - 3, 20 - diona.

FORMULA CONDENSADA:

$C_{24}H_{30}F_2O_6$

FORMULA DESARROLLADA:



PESO MOLECULAR:

452.50 g/mol

C 63.70 %, H 6.68%, F 8.40%, O 21.22%

DESCRIPCIÓN:

Polvo cristalino, blanco ó casi blanco, sin olor ni sabor.

SOLUBILIDAD:

El Acetónido de Fluocinolona es libremente soluble en tetrahidrofurano, soluble en acetona, cloroformo, propilenglicol y etanol, escasamente soluble en acetato de etilo, metanol y diclorometano, ligeramente soluble en acetonitrilo, muy ligeramente soluble en tolueno y prácticamente insoluble en hexano y agua.

FARMACOLOGÍA:

El Acetónido de Fluocinolona es un corticoesteroide, que ha demostrado después de varios estudios farmacológicos y clínicos las siguientes características:

1. Gran actividad antiinflamatoria: su actividad antiinflamatoria es 200 veces superior a la de la hidrocortisona.
2. Perfecta tolerancia: es perfectamente tolerado, según se confirma en las investigaciones farmacológicas realizadas. En el animal de experimentación no provoca irritación local ni signos de toxicidad general. En el hombre las pruebas epicutáneas (parche) practicadas han dado sistemáticamente resultados negativos.
3. Posibilidad de empleo prolongado: la ausencia de efectos generales, permite el empleo del Acetónido de Fluocinolona durante el tiempo necesario para lograr y mantener la curación de las lesiones. Algunos investigadores lo han utilizado ininterrumpidamente hasta por más de tres meses.

El Acetónido de Fluocinolona posee en su molécula varias innovaciones 1) producir máximo grado de actividad antiinflamatoria; 2) obtener la mayor especificidad de acción. Así se pueden enumerar las distintas características de su estructura química, tales como:

- a) la doble ligadura en la posición 1-2;
- b) el átomo de flúor en la posición 9;
- c) el hidroxilo en la posición 16;
- d) el átomo de flúor en el carbono 6;

todos estos grupos confieren un extraordinario aumento en la actividad antiinflamatoria del producto

e) el grupo acetónido en la posición 16 - 17 le confiere poder antiinflamatorio específico para su uso como agente tópico.

Los resultados de los estudios farmacológicos y clínicos demuestran que el Acetónido de Fluocinolona es el corticoesteroide más eficaz y mejor tolerado(27).

TOXICIDAD:

En el perro, la administración diaria de 0.01, 0.02 y 0.05 mg (Cinco animales por dosis) de Acetónido de Fluocinolona por kilogramo de peso corporal, durante tres meses, no provoca manifestaciones bioquímicas ni histológicas de toxicidad. También durante tres meses, la rata tolera sin trastornos de ningún género la administración oral de 2 microgramos diarios del corticoesteroide por kilogramo de peso.

En el hombre se han investigado los efectos de la administración oral del Acetónido de Fluocinolona. Los resultados obtenidos se resumieron de la siguiente manera:

1. La exploración física no reveló anomalías de ningún género.
2. No se observaron edemas ni cambios apreciables de peso.
3. La presión arterial y el fondo del ojo resultaron normales.
4. No se registraron alteraciones significativas de los datos de laboratorio (examen de heces, análisis de sangre, orina, pruebas de funcionamiento hepático, recuento de elementos formes de la sangre y determinación en suero de sodio, potasio, cloruros, calcio y fosfatasa alcalina).

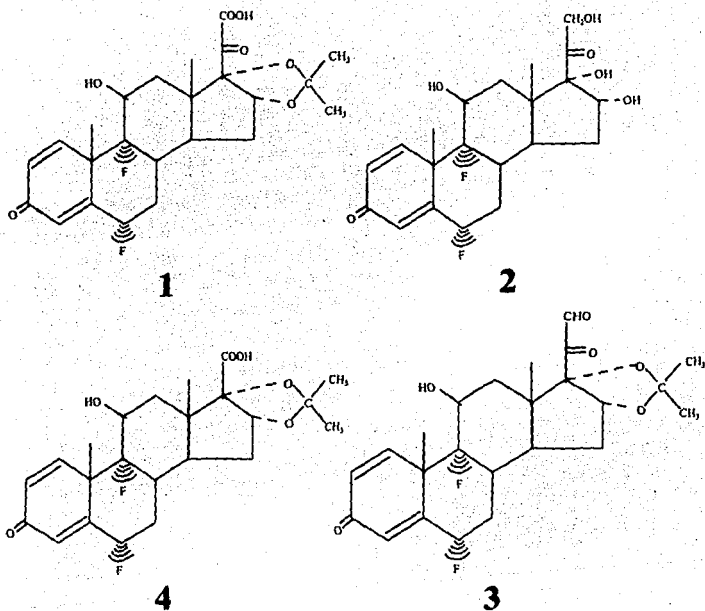


FIGURA No. 2
 PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DEL
 ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA

II.5 Propiedades del Sulfato de Neomicina

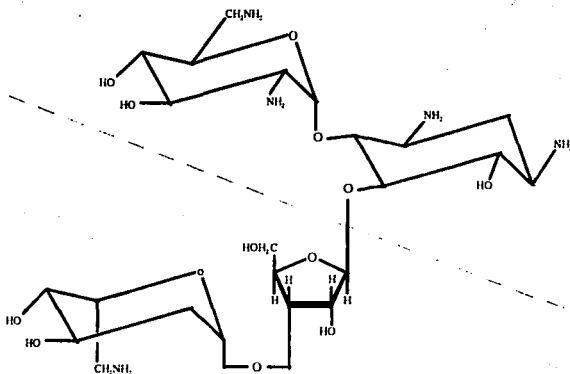
NOMBRE QUÍMICO:

O - 2, 6 - diamino - 2, 6 - didesoxi - alfa - D - glucopiranosil - (1 → 3) - O - beta - D - ribofuranosil - (1 → 5) O - [2, 6 - diamino - 2, 6 - didesoxi - alfa - D - glucopiranosil - (1 → 4)] - 2 - desoxi - D - estreptamina.

FORMULA CONDENSADA:



FORMULA DESARROLLADA:



DESCRIPCIÓN:

Polvo cristalino o sólido liofilizado blanco a un tanto amarillo, inodoro o casi inodoro e higroscópico; pH (solución acuosa, 33 mg/ml)

SOLUBILIDAD:

Es soluble en agua cerca de 1 g en 1 mL, ligeramente soluble en etanol, insoluble en acetona, cloroformo y éter.

El sulfato de neomicina es el sulfato de una sustancia antibacteriana producida mediante cultivo de *Streptomyces fradiae*. Equivale a no menos de 600 μg de neomicina/mg, calculado sobre el peso seco.

Es un complejo constituido por cuatro componentes, neomicina A, B, C y fradicina. En la actualidad se sabe que está formada por dos entidades isoméricas llamadas neomicina B y C. Algunos autores han clasificado a la neomicina B y C al igual que a la estreptomycinina y kanamicina como "antibióticos derivados de AZUCARES". Su estructura ha sido estudiada por Rinehart Jr(30), según este autor una molécula de neomicina contiene: neamina, diaminoxososa y ribosa.

Es eficaz contra diversas bacterias grampositivas, gramnegativas, contra bacilos y actinomicetos ácidos-resistentes, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Proteus*. Es un antibiótico de amplio espectro antimicrobiano. Se puede utilizar en solución isotónica de cloruro de sodio (5 mg/mL), en forma de irrigación, instilación en caso de irritaciones que acompañan a las infecciones oculares.

En práctica oftálmica, soluciones acuosas conteniendo 40 mg de neomicina base/mL pueden ser usados segura y efectivamente. No es inactivada por otros antibióticos y puede ser utilizada en formulaciones con polimixina, gramicidina o bacitracina.

Las formas farmacéuticas de neomicina son estables a temperatura ambiente, las soluciones son estables en un amplio margen de pH y existe una pequeña pérdida de potencia cuando las soluciones acuosas son almacenadas por algunos meses a temperatura ambiente. Simone & Popino(10) reportan que las soluciones diluidas son estables por más de dos años a temperatura ambiente. Incompatible en soluciones con sustancias aniónicas con la que puede formar un precipitado. Soluciones entre pH de 3 y 8 pueden esterilizarse por calor a 100 °C por 20 minutos.

Las concentraciones inhibitorias mínimas han sido reportadas en el rango entre 0.5 a 15 $\mu\text{g/mL}$ (10).

Soluciones conteniendo arriba de 40 mg/mL pueden ser instiladas en el ojo cada 2 o 3 horas cuando se necesita sin causar efectos desfavorables.

II.6 Propiedades del Sulfato de Polimixina B

DESCRIPCIÓN:

El sulfato de Polimixina B es la sal sulfato de una sustancia producida mediante cultivo de *Bacillus polymyxa*. Tiene una potencia no menor de 6,000 unidades de polimixina B/mg, calculada sobre la base anhidra.

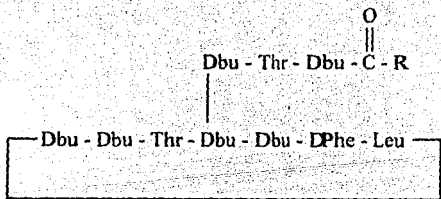
Existen varias polimixinas, todas ellas decapéptidos N - monoacilados con siete de los residuos de aminoácidos de unión cíclica.

Es un polvo blanco, inodoro y de olor tenue, cuyas soluciones son un tanto ácidas o neutras al tornasol, con un pH de 5.00 a 7.50.

FORMULA CONDENSADA:

La polimixina B es una mezcla de polimixina B₁ (C₅₆H₉₈N₁₆O₁₃) y polimixina B₂ (C₅₅H₉₆N₁₆O₁₃), siendo la única diferencia la composición del grupo acilo.

FORMULA SEMIDESARROLLADA:



Dbu = Acido 2, 4 - diaminobutírico

Thr = Treonina

DPhe = D-Fenilalanina

Leu = Leucina

Polimixina B₁ R = (+) - 5 - metilheptilo

Polimixina B₂ R = 5 - metilhexilo

SOLUBILIDAD:

Es soluble en agua y metanol, pero su solubilidad disminuye cuando aumenta la serie alcohólica. Insoluble en éter, acetona, solventes clorados, hidrocarburos.

El sulfato de polimixina es la forma que se utiliza medicinalmente. Es no tóxico, no irritante tópicamente, se considera no sensibilizante. Es uno de los más potentes antibióticos contra bacterias gramnegativas, estos organismos raramente desarrollan resistencia hacia él, in vivo. Es efectivo contra *E. coli*, *Shigella* y *Pseudomona aeruginosa* entre otros.

Es utilizado frecuentemente en infecciones localizadas, oculares, del oído y en dermatología. En infecciones oculares, especialmente las formas más agudas de conjuntivitis responden bien a la polimixina.

Las polimixinas son termoestables en soluciones acuosas neutras o débilmente ácidas, en soluciones alcohólicas ácidas diluidas cercanas a la neutralidad; pero su actividad se pierde rápidamente en ácidos o álcalis fuertes. El rango de pH entre 3.0 y 5.0 favorece la retención máxima de potencia en soluciones de sulfato de polimixina(10). La actividad antimicrobiana de la polimixina B es reversible en la presencia de iones como Mg, Co, Fe o Mn; compuestos que liberan estos iones se deben evitar en formulaciones con polimixina. Pruebas experimentales sugieren que estos iones bivalentes no inactivan la polimixina, si no que interfieren en su absorción por las bacterias, siendo estos efectos reversibles por el citrato.

III.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una formulación para una solución oftálmica estéril, la cual incluirá como principios activos al Acetonido de Fluocinolona, Sulfato de Neomicina y Sulfato de Polimixina B.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer el sistema de cosolvencia adecuado para conseguir la solubilización del Acetonido de Fluocinolona en función de un diseño experimental.

- Evaluar el efecto que tienen el pH y diferentes agentes antioxidantes y/o quelantes en la estabilidad del Acetonido de Fluocinolona.

- Elegir un agente conservador para garantizar la esterilidad de la solución por ser multidosis.

- Efectuar la prueba de esterilidad y de irritabilidad ocular a la formulación final para asegurar que cumple con los requerimientos establecidos para una solución oftálmica.

- Someter a estabilidad acelerada la formulación final para demostrar su estabilidad física, química y microbiológica.

IV.- PARTE EXPERIMENTAL.

IV.1 Materias primas y materiales

MATERIA PRIMA

Acetónido de Fluocinolona, FEUM.
Sulfato de Neomicina, FEUM.
Sulfato de Polimixina B, FEUM.
Propilenglicol, FEUM.
Polietilenglicol 400, NF.
Glicerina, FEUM.
Polisorbato 20, NF.
Polisorbato 80, NF.
Laurilsulfato de Sodio, NF.
Formaldehído Sulfoxilato de Sodio, NF.
Metabisulfito de Sodio, FEUM.
Edetato Disódico, FEUM.
Benzoato de Sodio, FEUM.
Tiomersal, FEUM.
Agua Purificada, FEUM.

MATERIAL DE EMPAQUE

Frasco Gotero de Polietileno de Baja Densidad, pigmentado en blanco, de 15 mL, Estéril.
Tapón para Frasco Gotero de Polietileno de Alta Densidad, pigmentado en blanco, Estéril.
Inserto Gotero de Polietileno de Baja Densidad de color natural, Estéril.

EQUIPO Y MATERIAL DE MANUFACTURA

Balanza de 0.010 g de sensibilidad.
Balanza de 0.0001 g de sensibilidad.
Espátula de Acero inoxidable (304 ó 316).
Tanque de Nitrógeno.
Agitador de propela.
Termómetro.
Baño de temperatura controlada.
Potenciómetro Beckman equipado con electrodos de vidrio y calomel, ó combinado.
Dosificador Manual "REFIPET".

Tela de Nylón "Monyl" No. 150 (9 XX) ASTM.
Equipo "Millipore" equipado con prefiltro AP15 293
ó AP25 293 y membrana GVWP 293 25 de 0.22 micras ó
equivalente.
Vasos de precipitado de 3000, 1000, 500, 250, 100 y
50 mL.

IV.2 CUANTIFICACIÓN DE ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCION

REACTIVOS

Acetonitrilo HPLC.
Agua HPLC.
Ácido acético glacial.
Acetónido de Fluocinolona estándar de referencia.
Noretindrona estándar interno.

MATERIAL

Filtros GVWP de 0.22 micras y HA de 0.45 micras.
Balanza analítica.
Baño de ultrasonido.
Agitador Super Mixer.

SISTEMA CROMATOGRÁFICO

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución, equipado con detector de longitud de onda variable, bomba e inyector automático, Hewlett-Packard.
Integrador automático Hewlett-Packard.
Columna analítica μ Bondapack C₁₈, de 300 x 3.9 mm Waters.
Precolumna empacada con CO:PELL ODS, de 30 mm Whatman.

PREPARACIÓN DE LA FASE MÓVIL

Mezclar 620 mL de agua grado cromatográfico, previamente filtrada por membrana GVWP, con 370 mL de acetonitrilo previamente filtrado por membrana HA y 10 mL de ácido acético glacial. Al final se obtiene la siguiente proporción: Agua:Acetonitrilo:Acido Acético; 62:37:1.

Degasificar la fase móvil por burbujeo de helio durante 3 minutos.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Velocidad de flujo:	1 mL/min.
Presión:	1000 psi.
Sensibilidad:	0.05 AUFS.
Velocidad de la carta:	0.20 cm/min.
Volumen de inyección:	15 μ L.
Longitud de onda:	254 nm.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

Solución stock de estándar interno: Pesar exactamente alrededor de 10 mg de noretindrona en un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 62 mL de acetonitrilo, disolver en el baño de ultrasonido durante 1 minuto. Dejar que la solución se enfríe a temperatura ambiente. Aforar con agua grado cromatográfico.

Solución stock de estándar de calibración: Pesar con exactitud y por separado, alrededor de 12, 15 y 18 mg de Acetonido de Fluocinolona estándar de referencia en matraces volumétricos de 100 mL. Adicionar 62 mL de acetonitrilo. Disolver en el baño de ultrasonido. Aforar con agua destilada grado cromatográfico.

Solución de trabajo de estándar de calibración: Transferir por separado 1 mL de solución stock de estándar interno de noretindrona y 1 mL de cada solución stock de estándar de referencia de Acetonido de Fluocinolona a tres matraces volumétricos de 10 mL. Mezclar y aforar con fase móvil. Las soluciones corresponden al 80, 100 y 120 % de Acetonido de Fluocinolona.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para el análisis tomar una alícuota de 1 mL de muestra, llevar a un matraz volumétrico de 10 mL. Adicionar 1 mL de solución stock de estándar interno de noretindrona. Mezclar y aforar con fase móvil.

Inyectar 15 μ L de cada una de las soluciones de los estándares de calibración y de las muestras al sistema cromatográfico descrito anteriormente.

CÁLCULOS

Calcular el factor de respuesta (FR) para cada una de las soluciones estándar de calibración

$$FR = \frac{A_i}{A_e} \times \frac{P_e}{100 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \quad (25)$$

Donde:

A_i = Altura del pico de Acetónido de Fluocinolona en la solución estándar.

A_e = Altura del pico del estándar interno de noretindrona en el cromatograma del estándar de calibración.

P_e = Peso del Acetónido de Fluocinolona en mg, utilizado para preparar las soluciones stock.

Calcular el factor de respuesta promedio (FRP) de cada uno de los estándares de calibración, y el coeficiente de variación (CV). Si el CV es menor o igual a 1.5 % continuar con el análisis, de no ser así investigar la fuente de error y repetir la preparación de las soluciones estándar de ser necesario.

Calcular los mg/mL de Acetónido de Fluocinolona en la muestra:

$$\text{mg/ml} = FRP \times \frac{A_m}{A_i} \times 10 \text{ mL} \quad (26)$$

Donde:

FRP = Factor de respuesta promedio

A_m = Altura del pico de Acetónido de Fluocinolona en la muestra.

A_i = Altura del pico del estándar interno de noretindrona.

Calcular el contenido químico del Acetónido de Fluocinolona en la muestra.

$$\% \text{ Etiquetado} = \frac{\text{mg/mL encontrados}}{\text{mg/mL teóricos}} \times 100$$

(27)

donde los mg/mL teóricos son 15 mg/mL.

NOTA: Realizar el análisis de las muestras por duplicado.

IV.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE SULFATO DE NEOMICINA

EQUIPO

Cilindros de acero inoxidable con las dimensiones estándar USP XXII.
 Medidor de zonas de inhibición.
 Incubadora a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
 Autoclave.
 Horno esterilizador.
 Espectrofotómetro.

REACTIVOS Y ORGANISMO DE PRUEBA

Organismo de prueba: Staphylococcus aureus ATCC 6538-P

Medio de cultivo: Medio de antibióticos No. 1 para mantener el organismo de prueba, medio de antibióticos No. 11 para preparar la capa base y medio de antibióticos No. 11 para la capa inoculada.

Solución reguladora de fosfatos No. 3 pH 8.0 ± 0.1 .

Fosfato de Potasio dibásico anhidro.	16.730 g
Fosfato de Potasio monobásico anhidro.	0.523 g
Agua destilada cbp.	1000.000 mL

Ajustar el pH con ácido fosfórico 18.0 N ó Hidróxido de Potasio 10.0 N.

Solución Salina Estéril 0.90 %.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PATRÓN

Pesar una cantidad de sulfato de Neomicina que sea equivalente a 5.25 mg de Neomicina base (previamente secada durante 3 horas a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 5 mm Hg de presión) en un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver con solución reguladora No. 3 y llevar al aforo (conc. aprox. 0.21 mg/mL).

Tomar 5 mL de la solución anterior y colocarlo en un matraz volumétrico de 50 mL, aforar con la solución reguladora No. 3. Esta será la dosis alta de la solución patrón (conc. aprox. 0.021 mg/mL).

De esta solución transferir 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL y aforar con solución reguladora No. 3. Esta será la dosis baja de la solución patrón (conc. aprox. 0.0042 mg/mL).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Agitar la muestra, pipetear 1 mL con pipeta volumétrica y transferirlo a un matraz volumétrico de 50 mL. Aforar con solución reguladora No. 3; de la solución anterior tomar 3 mL y llevarlos a 10 mL con la misma solución reguladora. Esta será la dosis alta de la muestra (conc. aprox. 0.021 mg/mL).

De esta solución transferir 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL, aforar con solución reguladora No. 3. Esta será la dosis baja de la muestra (conc. aprox. 0.0042 mg/mL).

PREPARACIÓN DEL INOCULO DE PRUEBA

Mantener el microorganismo de prueba a 5 °C en tubos inclinados con medio de antibiótico No. 1, efectuando resiembras mensualmente. Un día previo al ensayo resembrar el microorganismo e incubar a 35 °C durante 16 horas.

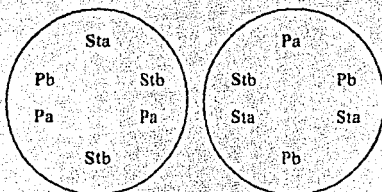
Al término de este tiempo suspender el organismo con solución salina estéril, esta suspensión se usará para preparar la capa inoculada. Efectuar pruebas de cilindro en placa para encontrar la cantidad óptima del inóculo que debe agregarse a cada 100 mL de medio de antibióticos No. 11, a una temperatura de 52 °C, para obtener zonas de inhibición claras y definidas al efectuar la prueba. Generalmente la transmitancia óptima del inóculo medida a 530 nm es de 7 % para utilizar 0.25 mL de este por cada 100 mL de medio.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Adicionar 21 mL del medio de antibiótico No. 11 estéril a cada caja y dejar solidificar el medio. Adicionar 4 mL del medio de antibiótico No. 11 inoculado a 52 °C, con movimientos circulares rápidos para distribuir uniformemente en la superficie de la capa base. Dejar solidificar y colocar en cada caja 6 cilindros a intervalos de $\pm 60^\circ$ en un radio de 2.80 cm

ENSAYO BIOLÓGICO 2 + 2 DOSIS

Utilizar series de 6 cajas de petri para cada problema, llenar cada cilindro con ayuda de una pipeta Pasteur, distribuyendo las muestras de la siguiente manera:



Donde:

Sta = Dosis alta de la solución patrón.

Stb = Dosis baja de la solución patrón.

Pa = Dosis alta del problema.

Pb = Dosis baja del problema.

Incubar las cajas a 35 °C durante 16 - 18 horas y medir las zonas de inhibición. De esta operación se obtienen 9 valores para cada concentración, tanto de los problemas como de los patrones.

CÁLCULOS

Promediar las lecturas correspondientes de las dosis altas y bajas tanto del problema como del patrón y utilizar las siguientes fórmulas:

Estimación de la diferencia en respuesta debida a la diferencia entre dosis alta y dosis baja.

$$E = \frac{1}{2} (Sta - Stb) + (Pa - Pb) \quad (28)$$

Estimación de la diferencia en respuesta debida a la diferencia entre la muestra y el estándar.

$$F = \frac{1}{2} (Pa - Sta) + (Pb - Stb) \quad (29)$$

Donde:

Stb y Pb: Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondiente a las soluciones patrón y problema de 0.0042 mg/mL respectivamente.

Sta y Pa: Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondiente a las soluciones patrón y problema de 0.0210 mg/mL respectivamente.

Relación de dosis.

$$i = \log = \frac{\text{Concentración de dosis alta del patrón}}{\text{Concentración de dosis baja del patrón}} \quad (30)$$

Estimación de la pendiente:

$$b = \frac{E}{i} \quad (31)$$

$$m = \frac{F}{b} \quad (32)$$

Relación de potencias:

$$R = \text{antilog } m \quad (33)$$

Potencia de la muestra:

$$(\text{mg/mL}) = R \times C \times D \quad (34)$$

Donde:

R = Relación de potencias.

C = concentración real de la dosis alta de la solución patrón.

D = Factor de dilución de la dosis alta de la solución problema.

$$C = \frac{\text{Potencia del St de referencia} \times \text{peso del St}}{\text{Dilución}} \quad (35)$$

Porcentaje calculado:

$$\% \text{ Calculado} = \frac{\text{Potencia de la muestra}}{\text{Potencia nominal}} \times 100 \quad (36)$$

IV.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE SULFATO DE POLIMIXINA B

EQUIPO

Cilindros de acero inoxidable con las dimensiones estándar USP XXII.
 Medidor de zonas de inhibición.
 Incubadora a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
 Autoclave.
 Horno esterilizador.
 Espectrofotómetro.

REACTIVOS Y ORGANISMO DE PRUEBA

Organismo de prueba: Bordetella bronchiseptica ATCC 4617.

Medio de cultivo: Medio de antibióticos No. 1 para mantener el organismo de prueba, medio de antibióticos No. 9 para preparar la capa base y medio de antibióticos No. 10 para la capa inoculada.

Solución reguladora de fosfatos No. 6 de pH 6.0 al 10.0 %.

Fosfato de Potasio dibásico anhidro.	20.0 g
Fosfato de Potasio monobásico anhidro.	80.0 g
Agua destilada cbp.	1000.000 mL

Ajustar el pH con ácido fosfórico 18.0 N 6
 Hidróxido de Potasio 10.0 N.

Solución Salina Estéril 0.90 %.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PATRÓN

Pesar una cantidad de sulfato de Polimixina B que sea equivalente a 50,000 UI (previamente secada durante 3 horas a 60°C y 5 mm Hg de presión) en un matraz volumétrico de 25 mL. Disolver con agua destilada a una relación de 2 mL de agua por cada 5 mg de peso del antibiótico. Llevar al aforo con solución reguladora No. 6 (conc. aprox. 2000 UI/mL).

Tomar 1 mL de la solución anterior y colocarlo en un matraz volumétrico de 50 mL. Aforar con la solución reguladora No. 6. Esta será la dosis alta de la solución patrón (conc. aprox. 40 UI/mL).

De la solución anterior, transferir 5 mL a un matraz volumétrico de 25 mL. Aforar con la solución reguladora No. 6. Esta será la dosis baja de la solución patrón (conc. aprox. 8 UI/mL).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Transferir 1 mL de la muestra a un matraz volumétrico de 50 mL. Aforar con la solución reguladora No. 6. De esta solución tomar 5 mL y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL, aforar con la solución reguladora. Esta será la dosis alta de la muestra (conc. aprox. 40 UI/mL).

De la dosis alta de la muestra, pipetear 5 mL y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL, aforar con la solución reguladora No. 6. Esta será la dosis baja de la muestra (conc. aprox. 8 UI/mL).

PREPARACIÓN DEL INOCULO DE PRUEBA

Mantener el organismo de prueba a 5 °C en tubos inclinados con medio para antibióticos No. 1, efectuando resiembras mensualmente. Un día previo al ensayo, resembrar el organismo de prueba e incubar a 35 °C durante 16 horas.

Al término de este tiempo suspender el organismo con la solución salina estéril, esta suspensión se usará para preparar la capa inoculada. Efectuar pruebas de cilindro en placa para encontrar la cantidad óptima de inóculo que debe agregarse a cada 100 mL de medio para antibióticos No. 10, a una temperatura de 52 °C, para obtener zonas de inhibición claras y definidas al efectuar la prueba. Generalmente la transmitancia óptima del inóculo medida a 530 nm es de 25 % para utilizar 0.2 mL de éste por cada 100 mL de medio.

PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Adicionar 21 mL del medio para antibiótico No. 9 estéril a cada caja y dejar solidificar el medio. Adicionar 4 mL de medio para antibiótico No. 10 estéril con movimientos circulares rápidos para distribución uniforme en la superficie de la capa base. Dejar solidificar y colocar en cada caja 6 cilindros a intervalos de $\pm 60^\circ$ en un radio de 2.80 cm.

ENSAYO BIOLÓGICO 2 + 2 DOSIS

Realizar siguiendo el mismo procedimiento indicado para la determinación de la actividad biológica del sulfato de neomicina.

CÁLCULOS

Realizar siguiendo el mismo procedimiento indicado para la determinación de la actividad biológica del sulfato de neomicina, tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

Para las ecuaciones (28) y (29):

Stb y Pb: Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondiente a las soluciones patrón y problema de 8 UI/mL respectivamente.

Sta y Pa: Diámetro promedio de las zonas de inhibición correspondiente a las soluciones patrón y problema de 40 UI/mL respectivamente.

IV.5 PRUEBA DE ESTERILIDAD

MATERIALES Y EQUIPO

Medio caldo Tioglicolato.
 Medio Caldo Soya Trypticaseina.
 Agar Soya Trypticaseina.
 Agar Patata Dextrosa.
 Bacto-peptona 0.10 %.
 Agar Bacteriológico.
 Solución Salina 0.85 % Estéril.
 Polisorbato 80.
 Equipo de Filtración por Membrana Estéril.
 Membranas estériles para filtración 0.45 μ m.
 Tubos de 35 mm x 200 mm.
 Tijeras Estériles.
 Pinzas Estériles.
 Jeringas Estériles.
 Equipo para Anaerobiosis.
 Tubos de 16 mm x 150 mm.
 Pipetas Estériles.
 Cajas de Petri 100 x 15 mm.
 Incubadora 20 - 25 °C.
 Incubadora 30 - 35 °C.

ORGANISMO DE PRUEBA

Clostridium sporogenes ATCC 11437
Bacillus subtilis ATCC 6633
Candida albicans ATCC 10231
Aspergillus niger ATCC 16404

PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO

Para cada lote de medio de cultivo esterilizado se debe de realizar la prueba de promoción de crecimiento como se detalla a continuación:

Preparar las suspensiones de los microorganismos de prueba e inocular de 10 a 100 microorganismos viables a los contenedores de prueba por duplicado e incubar a las temperaturas que se especifican en la siguiente tabla:

MEDIO	MICROORGANISMO DE PRUEBA	TEMPERATURA DE INCUBACIÓN (°C)	CONDICIONES
Caldo tioglicolato	<i>Bacillus subtilis</i>	30 - 35	Aeróbicas
	<i>Cándida albicans</i>	30 - 35	Aeróbicas
	<i>Clostridium sporogenes</i>	30 - 35	Anaeróbicas
Caldo Soya-Trypticaseína	<i>Bacillus subtilis</i>	20 - 25	Aeróbicas
	<i>Cándida albicans</i>	20 - 25	Aeróbicas
	<i>Aspergillus niger</i>	20 - 25	Aeróbicas

Confirmar el inóculo realizando cuenta en placa

NOTA: Para obtener la suspensión de esporas de *Aspergillus niger* usar solución salina estéril con polisorbato 80 al 0.50 %.

La esterilidad del medio se confirmará al incubar contenedores control a la temperatura y tiempo especificado en la prueba

La prueba es satisfactoria si existe clara evidencia de crecimiento en todos los contenedores inoculados dentro de un período de 7 días.

La prueba de esterilidad se considerará inválida si los controles muestran crecimiento.

PRUEBA DE ESTERILIDAD

La prueba debe ser realizada bajo flujo laminar, en un área que ha sido previamente sanitizada con un agente antimicrobiano (por ejemplo: Cloruro de Benzalconio al 0.1 %), el analista deberá estar atraviado apropiadamente para manipulaciones estériles (guantes, cubrebocas, cofia, etc).

Adicionalmente, la superficie exterior de los contenedores del producto deberán ser sanitizados con un agente descontaminante (por ejemplo alcohol isopropílico al 70.0 %). La apertura de los contenedores será de manera aséptica. Durante el tiempo en que se realice la prueba, el aire bajo flujo laminar es monitoreado.

mediante la exposición de 2 placas con agar soya-tripticaseína. Después de completada la prueba, una de las placas es incubada a 30 - 35 °C por 7 días y la otra de 20 - 25 °C durante 7 días.

Los microorganismos aislados en el monitoreo deben ser teñidos por la técnica de Gram, sin importar que la prueba de esterilidad sea positiva o negativa. Todos los microorganismos Gram negativos aislados deben ser identificados si la prueba de esterilidad es positiva; posteriormente todos los microorganismos aislados del monitoreo ambiental deberán ser identificados y comparados con el contaminante aislado en la muestra analizada, con el objeto de interpretar si la contaminación en el producto se llevó a cabo durante la prueba de esterilidad.

Transferir asépticamente 5 mL de cada contenedor (se emplearon un total de 20 contenedores por cada medio) en un recipiente con 40 mL del medio de cultivo. Mezclar la muestra con el medio de cultivo, pero no airear excesivamente. Incubar el caldo tioglicolato a 30 - 35 °C y el caldo soya-tripticasa a 20 - 25 °C durante 14 días.

Examinar visualmente el medio diariamente durante todo el periodo de prueba.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Si existiera crecimiento microbiano, pero una revisión de la prueba de esterilidad en el monitoreo ambiental, material utilizado, procedimiento de prueba y controles negativos indicaran que estos fueron inadecuados y/o además de una técnica aséptica defectuosa usada en esa prueba, la prueba no es válida y debe ser repetida.

Si se observara crecimiento microbiano, pero este no mostrara evidencias de condiciones inadecuadas como las anteriormente descritas, se procede a repetir la prueba, pero con el doble de contenedores a los usados en la primera prueba.

Si no existiere crecimiento microbiano en esta segunda prueba; se concluye que la muestra analizada cumple con los requerimientos de esterilidad.

Si se presentara crecimiento microbiano en esta segunda prueba; se concluye que la muestra analizada no cumple con los requerimientos de la prueba de esterilidad.

IV.6 DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE CONSERVADORES ANTIMICROBIANOS

EQUIPO

Autoclave.
Horno Esterilizador.
Cuenta colonias
Incubadora a 35 °C ± 0.5 °C
Incubadora a 25 °C ± 0.5 °C

REACTIVOS Y ORGANISMOS DE PRUEBA

Organismos de prueba: Cándida albicans ATCC-10231, Aspergillus niger ATCC-16404, Escherichia coli ATCC-8739, Pseudomona aeruginosa ATCC-9027 y Staphylococcus aureus ATCC-6538P.

Medios de cultivo: Agar Soyatripticaseína para *S. aureus*, *Ps. aeruginosa* y *E. coli*; Agar Dextrosa Sabouraud para *C. albicans* y *A. niger*.

Solución caseína-lectina de soya-polisorbato 20 para las diluciones necesarias.

Solución Salina Estéril 0.90 %

Solución Salina Estéril 0.90 % con polisorbato 80 0.05 %

PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Previo a la prueba, cultivar en placa cada uno de los organismos de prueba (excepto *A. niger*) en los medios indicados, incubar las bacterias a 35 °C por 24 horas y *C. albicans* a 25 °C por 48 horas. Verificar su pureza y seleccionar una colonia aislada de cada cultivo para inocular por estría en tubos inclinados con los medios correspondientes e incubar.

Al término del tiempo indicado, colectar el crecimiento en solución salina estéril.

Resembrar *A. niger* por picadura en tubos inclinados con agar sabouraud e incubar a temperatura ambiente

durante 2 semanas. Al término de este periodo, colectar el organismo en solución salina con polisorbato 80.

De cada una de las suspensiones del organismo, hacer las diluciones necesarias con solución salina para obtener una suspensión con organismos viables de aproximadamente 200×10^6 organismos/mL, determinado por cuenta en placa utilizando los medios correspondientes.

Estas suspensiones serán utilizadas para inocular los productos a probar; mantenerlas en refrigeración determinando periódicamente su viabilidad.

ENSAYO

Utilizar seis frascos del producto a probar (de preferencia en el contenedor original), con una cantidad mínima de 20 mL (g). Inocular 5 frascos con las suspensiones estandarizadas con cada uno de los 5 microorganismos, utilizando una relación de 0.1 mL de suspensión por cada 20 mL (g) de producto, y mezclar; el frasco restante se usará como testigo, con el objeto de detectar la presencia de algún microorganismo contaminante.

Usar cinco contenedores similares al del producto que contengan una formulación placebo de los conservadores del producto a probar (6 en su defecto con solución salina al 0.9 %) e inocularlos de manera similar al producto original; estos se utilizarán como control de monitoreo de los organismos.

Determinar inmediatamente el número de organismos viables en cada suspensión inoculada por cuenta en placa, y calcular la concentración inicial de organismos/mL (g). Utilizar para la cuenta un inactivador del (los) conservador (es) presentes (tal como solución de caseína-lecitina de soya-polisorbato 20 usado como diluyente). Incubar las placas de la siguiente manera:

Bacterias a 35 °C por 24 horas
C. albicans a 25 °C por 48 horas

Aquellas placas pertenecientes a una dilución de 10^{-1} (tomadas de las suspensiones inmediatamente después de la inoculación) que no presenten crecimiento de organismo, se inocularán por estria con el organismo correspondiente e incubar a $30 - 35^{\circ}\text{C}$ por 24 - 48 horas, con el objeto de determinar si el conservador fué inactivado.

Al término del tiempo de incubación, si hay crecimiento es indicativo de que el conservador fue inactivado; si no hay crecimiento, es indicativo que hubo inhibición, por lo que ésta parte de la prueba no será válida. Se buscará un inactivador adecuado del conservador y se repetirá la prueba.

Incubar todas las formulaciones inoculadas a $20-25^{\circ}\text{C}$ durante 28 días.

Determinar el número de organismos viables en el día No. 1, 7, 14, 21 y 28 después de la inoculación. Si se obtiene un resultado de cero organismos viables en la cuenta del día 7 ó 14 en el producto en prueba, inocular el contenedor con 0.1 mL del organismo correspondiente ajustado a una cuenta viable de 200×10^5 organismos/mL bajo las mismas condiciones que en la inoculación inicial.

Continuar la prueba hasta su término y calcular en cada intervalo de tiempo el porcentaje de la concentración de cada organismo viable.

RESULTADO E INTERPRETACIÓN

El (los) conservador (es) es (son) efectivo(s) en el producto si:

- a) La concentración de bacterias viables se reduce a no más del 0.1 % de la concentración inicial en el día 14.
- b) La concentración de levaduras y hongos viables permanece en o abajo de la concentración inicial durante los primeros 14 días.

- c) La concentración de cada organismo permanece en o abajo de lo aceptado en a) y b) durante el resto de los 28 días que dura la prueba.
- d) Lo anterior se aplica en los casos en donde la muestra se inoculó una sola vez; aquellas muestras con segunda inoculación, se considerará efectivo el conservador con las condiciones a) y b) aplicadas al día 28, además de cumplir con los requisitos del día 14.

IV.7 PRUEBA DE IRRITABILIDAD OCULAR

ORGANISMO DE PRUEBA

6 Conejos de cualquier sexo, de entre 2.0 y 2.5 Kg de peso por cada muestra.

REACTIVOS Y MATERIAL

Solución Salina Fisiológica Estéril.

Fluoresceína Sódica, USP.

Lámpara de luz ultravioleta.

Lupa

Pipeta de 0.10 mL.

PROCEDIMIENTO

Para cada muestra utilizar 6 conejos de cualquier sexo, de entre 2.0 y 2.5 Kg de peso, debiendo estar seguros de que antes y durante la prueba, estos animales se han mantenido en condiciones óptimas, a fin de evitar que les caiga al ojo polvo, aserrín o cualesquier otro material extraño que pueda producir irritación ocular.

Examinar ambos ojos de cada animal que se pretende emplear para la prueba, y únicamente escoger aquellos animales sin defectos o irritación ocular. Sujetar a cada animal firme pero suavemente para que permanezca quieto.

Aplicar 0.1 mL de la muestra a probar a un ojo de cada animal, jalando suavemente hacia afuera el párpado inferior del globo ocular, a modo de formar una especie de recipiente en el cual se deposite la muestra. Mantener así los párpados suavemente por un segundo, y dejar al animal en reposo. El otro ojo que permanece sin tratar, sirve como control.

Examinar los ojos a las 24, 48 y 72 horas y registrar el grado de reacción ocular.

Si se juzga conveniente, alguno o todos los ojos pueden lavarse con solución salina fisiológica estéril, después de la lectura a las 24 horas.

PARÁMETROS DE INTERPRETACIÓN

Se consideran 4 parámetros para la interpretación de la prueba: opacidad de la córnea, iritis, enrojecimiento de la córnea y quemosis.

Se debe considerar que un animal exhibe una reacción positiva si la muestra en prueba produce, a cualesquiera de las lecturas, ulceración de la córnea (que no sea un punteado fino), opacidad de la misma (que no sea una disminución ligera del lustre normal), iritis (que no sea una ligera profundización de los dobleces o una leve inyección de los vasos sanguíneos circuncorneales), o si dicha sustancia produce en la conjuntiva excluyendo la córnea y el iris, una inflamación obvia con eversión parcial de los párpados o un enrojecimiento carmesí difuso, con los vasos individuales no discernibles con facilidad.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La prueba debe considerarse positiva si cuatro o más de los animales en el grupo de prueba, exhiben una reacción positiva. Si solo un animal exhibe una reacción positiva, la prueba debe considerarse negativa. Si dos o tres animales muestran una reacción positiva, la prueba se repite empleando un grupo diferente de seis animales.

La segunda se considerará positiva si tres o más de los animales exhiben una reacción positiva. Si solo uno o dos de los animales de la segunda prueba exhiben una reacción positiva, la prueba debe repetirse con un grupo diferente de seis animales.

En caso de que se requiera una tercera prueba, la muestra en prueba se considerará como irritante si cualquier animal exhibe una reacción positiva.

IV.8 DESARROLLO EXPERIMENTAL

IV.8.1 Selección del sistema de cosolventes para solubilización del Acetónido de Fluocinolona

Realizando una revisión de los principios activos a utilizar en la nueva formulación se encontró que desde el punto de vista teórico la asociación de antibióticos a utilizar es efectiva y no presenta incompatibilidades(10). En lo que se refiere a la asociación de los antibióticos con el corticoesteroide a emplear tampoco se han reportado incompatibilidades(30) y que además, hablando terapéuticamente, la asociación de los principios activos es efectiva(1) (2) (3).

Las concentraciones de cada uno de los principios activos a manejar en la fórmula son las siguientes:

Cada 100 mL contienen:	
Acetónido de Fluocinolona	0.015 g
Neomicina base	0.350 g
Polimixina B base	1.000 MU

Respecto a la solubilidad de los principios activos, el sulfato de Neomicina y el sulfato de Polimixina B son solubles en agua, pero el Acetónido de Fluocinolona es insoluble en agua, por lo que en la primera fase del desarrollo de la fórmula se estableció el sistema de cosolventes para poder solubilizar al activo. Para este efecto se probaron los siguientes cosolventes:

COSOLVENTES	NIVEL DE CONCENTRACION
	ALTO
POLIETILENGLICOL 400	8.50 %
GLICERINA	2.60 %
PROPILENGLICOL	2.20 %

Los niveles altos son las concentraciones en donde cada uno de ellos por si solos dan una isotonicidad

equivalente a una solución de cloruro de sodio al 0.90 % (21).

IV.8.1.1 Diseño experimental

En este punto se estableció un diseño simplex restringido, en donde las mezclas de cosolventes a estudiar se encuentran dentro de los límites de la isotonicidad. El diseño planteado fué para una mezcla de 4 componentes, en donde se consideró al agua como parte de la mezcla. Algo que caracteriza al Acetonido de Fluocinolona es que cuando se degrada en solución, éste adquiere una ligera coloración amarilla, por lo que en esta fase también se evaluó el efecto que tiene el burbujear nitrógeno a la solución para desplazar oxígeno y así mejorar la estabilidad del activo en solución.

El número de experimentos y el orden de corrida se describe a continuación:

OBSERVACION	ORDEN DE CORRIDA	X ₁ PEG 400	X ₂ GLICERIN A	X ₃ PROPILENGLICO L	X ₄ AGUA
3	1	0.0000	0.0000	0.0200	0.9800
1	2	0.0000	0.0000	0.0220	0.9780
2	3	0.0283	0.0086	0.0073	0.9558
9	4	0.0425	0.0130	0.0000	0.9445
4	5	0.0425	0.0000	0.0110	0.9465
6	6	0.0850	0.0000	0.0000	0.9150
7	7	0.0000	0.0260	0.0000	0.9740
10	8	0.0200	0.0000	0.0000	0.9800
5	9	0.0000	0.0200	0.0000	0.9800
8	10	0.0000	0.0130	0.0110	0.9760

las proporciones están dadas en fracción para que sumadas den 1.0. El tamaño de lote fue de 1.0 Lt

IV.8.1.2 Procedimiento de manufactura

1.- Verificar la limpieza e identificar todo el equipo y áreas a utilizar, así como verificar el equipo de seguridad, de acuerdo a las buenas prácticas y procedimientos de manufactura.

2.- En un vaso de precipitados de 1000.00 mL, adicionar 600.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; manteniendo la temperatura a 25 °C. Disolver con agitación constante:

100.00 % SULFATO DE NEOMICINA, FEUM
100.00 % SULFATO DE POLIMIXINA B, FEUM

Enjuagar el recipiente que contenía los antibióticos con 6.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM.

3.- Calentar en un vaso de precipitados el (los) cosolventes a una temperatura de 54 ± 4 °C.

*NOTA: La cantidad del (los) cosolventes va a depender de lo indicado en el diseño.

4.- Agregar el 100.00 % de ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; a la solución del paso 3 y mezclar hasta disolución total, manteniendo la temperatura de la solución a 54 ± 4 °C.

*NOTA: Evitar que la temperatura sobrepase los 58 °C, y una vez disuelto el ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; dejar enfriar para evitar degradación.

5.- Con agitación constante, agregar la solución del paso 4, a la solución del paso 2. Enjuagar el vaso de precipitados del paso 4 con 4.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; a 54 ± 4 °C y vaciar al vaso del paso 2. Continuar con la agitación hasta homogeneización total.

6.- Llevar el producto del paso 5 a un volumen de 1000.00 mL empleando la cantidad necesaria de AGUA PURIFICADA, FEUM. Mezclar hasta homogeneización total.

7.- Transferir la solución del paso 6 a un vaso de precipitados de 1000.00 mL, filtrando a través de tela de nylon "Monyl" No. 150 (9 XX) ASTM.

8.- Dividir la solución obtenida en el paso 7 en 2 fracciones de 500.00 mL cada una.

9.- A una de las fracciones burbujear NITRÓGENO por el espacio de 30 minutos. Dejar la otra fracción intacta.

10.- Con ayuda de un dosificador manual "REPITET" llenar los frascos gotero con las fracciones de la solución del paso 9 bajo la siguiente especificación:

VOLUMEN DE LLENADO	INTERVALO DE LLENADO
15.150 mL/Fco	15.000 - 15.300 mL/Fco

Terminada la manufactura de los lotes de prueba, muestras de éstos fueron sometidas a estabilidad acelerada bajo las siguientes condiciones:

No. DE FRASCOS	CONDICIÓN	DÍAS
15	37 °C	15
15	25 °C	15
10	5 °C	15
15	5 / 37 °C	15

Cabe mencionar que estudios previos han demostrado que una temperatura de 54 ± 4 °C ayuda a que la solubilización del Acetonido de Fluocinolona sea más rápida y que además no contribuye significativamente en su degradación(30).

IV.8.1.3 Variables de respuesta

Las variables de respuesta a evaluar fueron la presencia de precipitado y la coloración de la solución, los criterios de evaluación que se tomaron fueron los siguientes:

PRESENCIA DE PRECIPITADO	
VALOR NUMÉRICO	DESCRIPCIÓN
1	SIN PRECIPITADO
2	MUY LIGERAMENTE PRECIPITADO
3	LIGERAMENTE PRECIPITADO
4	MODERADAMENTE PRECIPITADO
5	MUY PRECIPITADO

COLORACIÓN DE LA SOLUCIÓN	
VALOR NUMÉRICO	DESCRIPCIÓN
0	SOLUCIÓN CLARA
1	SOLUCIÓN MUY LIGERAMENTE AMARILLA
2	SOLUCIÓN LIGERAMENTE AMARILLA
3	SOLUCIÓN MODERADAMENTE AMARILLA
4	SOLUCIÓN MUY AMARILLA

IV.8.2 Selección del agente tensoactivo para mejorar la solubilidad del Acetonido de Fluocinolona

Fue necesario el contemplar la utilización de un agente tensoactivo dentro de la formulación para mejorar la solubilidad del corticosteroide junto con el sistema de cosolventes definido. Los agentes tensoactivos a probar fueron los siguientes en los niveles de concentración que a continuación se indican:

TENSOACTIVOS	NIVEL DE CONCENTRACIÓN	
	BAJO	ALTO
LAURILSULFATO DE SODIO	0.50 %	1.00 %
POLISORBATO 20	0.50 %	1.50 %
POLISORBATO 80	0.50 %	1.50 %

los niveles de concentración de cada uno de los tensoactivos se establecieron de acuerdo a que en este intervalo se reporta presentan una acción como agente solubilizante, además de que su nivel bajo de concentración es cercano a su concentración micelar crítica (9) (31) (32).

IV.8.2.1 Matriz experimental

En este punto se trabajó de acuerdo a la siguiente matriz experimental:

TENSOACTIVOS		SISTEMA DE COSOLVENTES			
		I	II	III	IV
LAURILSULFATO DE SODIO	0.50 %				
	1.00 %				
POLISORBATO 20	0.50 %				
	1.50 %				
POLISORBATO 80	0.50 %				
	1.50 %				

Los sistemas de cosolvenencia que se indican en la matriz experimental corresponden a los definidos mediante la optimización del diseño simplex restringido (en la sección de resultados se define la composición de cada uno).

Se realizaron un total de 24 experimentos.

El tamaño de lote fue de 1.0 Lt

IV.8.2.2 Procedimiento de manufactura

1.- Verificar la limpieza e identificar todo el equipo y áreas a utilizar, así como verificar el equipo de seguridad, de acuerdo a las buenas prácticas y procedimientos de manufactura.

2.- En un vaso de precipitados de 1000.00 mL, adicionar 600.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; a una temperatura de 25 °C, disolver con agitación constante:

100.00 % TENSOACTIVO

Burbujear NITRÓGENO a la solución.

3.- Con agitación constante adicionar a la solución del paso 2:

100.00 % SULFATO DE NEOMICINA, FEUM

100.00 % SULFATO DE POLIMIXINA B, FEUM

Enjuagar el recipiente que contenía los antibióticos con 6.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM. Continuar con el burbujeo de NITRÓGENO

4.- Calentar en un vaso de precipitados el (los) cosolventes a una temperatura de 54 ± 4 °C.

*NOTA: La mezcla de cosolventes va a ser la indicada en la matriz experimental.

5.- Agregar el 100.00 % de ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; a la solución del paso 4, mezclar hasta disolución total. Mantener la temperatura de la solución a 54 ± 4 °C.

*NOTA: Evitar que la temperatura sobrepase los 58 °C, y una vez disuelto el ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; dejar enfriar para evitar degradación.

6.- Con agitación constante, agregar la solución del paso 5, a la solución del paso 3. Enjuagar el vaso de precipitados del paso 5 con 4.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; a 54 ± 4 °C y vaciar al vaso del paso 3. Continuar con la agitación hasta homogeneización total. Burbujear NITRÓGENO a la solución.

7.- Llevar el producto del paso 6 a un volumen de 1000.00 mL empleando la cantidad necesaria de AGUA PURIFICADA, FEUM. Mezclar hasta homogeneización total. Continuar con el burbujeo de NITRÓGENO.

8.- Transferir la solución del paso 7 a un vaso de precipitados de 1000.00 mL, filtrando a través de tela de nylon "Monyl" No. 150 (9 XX) ASTM.

9.- Con ayuda de un dosificador manual "REPITET" llenar los frascos gotero con la solución del paso 8 bajo la siguiente especificación:

VOLUMEN DE LLENADO	INTERVALO DE LLENADO
15.150 mL/Fco	15.000 - 15.300 mL/Fco

Terminada la manufactura de los lotes de prueba, muestras de éstos fueron sometidas a estabilidad acelerada bajo las condiciones ya descritas en la pagina 66

IV.8.2.3 Variables de respuesta

Las variables de respuesta a medir fueron el contenido químico y/o la potencia de cada uno de los principios activos. Los intervalos en los cuales se debe encontrar la potencia de cada uno de ellos son los siguientes:

PRINCIPIO ACTIVO	INTERVALO
Acetónido de Fluocinolona	90 - 110 %
Neomicina base	90 - 130 %
Polimixina B base	90 - 130 %

La cuantificación del contenido químico del Acetónido de Fluocinolona y la determinación de la actividad biológica de la neomicina y polimixina B se realizaron conforme a la metodología indicada en los puntos IV.2, IV.3 y IV.4 respectivamente.

IV.8.3 Selección del agente antioxidante

En esta fase se procedió a seleccionar el agente antioxidante y/o quelante como parte de la formulación para evitar la degradación de los principios activos, en especial el Acetónido de Fluocinolona.

Los agentes antioxidantes y/o quelantes a probar fueron seleccionados en base a las siguientes características (31) (32):

NOMBRE	TIPO DE AGENTE	SOLUBILIDAD EN AGUA	CONCENTRACIÓN
Metabisulfito de Sodio	Antioxidante (Reducción del Potencial REDOX)	Soluble	0.01 - 1.00 % (0.10 %)
Formaldehído Sulfoxilato de Sodio	Antioxidante	Soluble	(0.10 %)
E.D.T.A.	Quelante	Soluble	0.005 - 0.100 % (0.10 %)

Las concentraciones trabajadas de cada uno de los antioxidantes son las que se encuentran dentro del paréntesis en la tabla, siendo estas concentraciones las más usuales.

IV.8.3.1 Matriz experimental

En este punto se trabajó de acuerdo a la siguiente matriz experimental:

AGENTE ANTIOXIDANTE	SISTEMA SOLUBILIZANTE		
	I	II	III
Metabisulfito de Sodio			
Formaldehído Sulfoxilato de Sodio			
E.D.T.A.			

El sistema solubilizante que se indica en la matriz experimental es el que se definió con los resultados

obtenidos de la matriz experimental del punto IV.8.2.1 (se refiere al sistema de cosolvenencia más el agente tensoactivo; en la sección de resultados se define la composición de cada uno de ellos).

En esta fase a los lotes fabricados no se les burbujeo nitrógeno, ya que se evaluó la efectividad del antioxidante sin el desplazamiento de oxígeno.

El tamaño de lote fue de 1.0 Lt.

El número total de experimentos realizados fue de 9.

IV.8.3.2 Procedimiento de manufactura

El procedimiento de manufactura seguido es el que se indica en el punto IV.8.2.2, con la observación que en el paso 3, después de incorporar los antibióticos, se adicionó el 100 % del antioxidante en estudio.

Terminada la manufactura de los lotes de prueba, muestras de éstos fueron sometidas a estabilidad acelerada bajo las condiciones que se describen en la pagina 66.

IV.8.3.3 Variables de respuesta

La variable de respuesta a medir fue el contenido químico del Acetonido de Fluocinolona. La valoración de la actividad biológica de la Neomicina y de la Polimixina B no se realizó, debido a que en los resultados obtenidos en la fase que corresponde a la selección del agente tensoactivo, se observó que su potencia no se ve afectada significativamente por las condiciones de estabilidad acelerada a las que se somete la solución (ver tabla No. 3).

IV.8.4 Optimización de la formulación

IV.8.4.1 Diseño central compuesto

Habiéndose seleccionado el sistema de cosolvencia, concentración del tensoactivo y tipo de agente antioxidante; se procedió a la optimización de la formulación tentativa para establecer una fórmula definitiva.

Para este fin se realizó un diseño central compuesto, en donde las variables en estudio fueron las siguientes:

a) Tipo de sistema de solubilización: se trabajó con 2 tipos diferentes; sistema I el cual incluye polisorbato 20 (1.50 %), propilenglicol (1.10 %) y polietilenglicol 400 (4.25 %); y el sistema III que incluye polisorbato 80 (1.50 %) y polietilenglicol 400 (8.25 %). Aquí se evaluó si el tipo de sistema de solubilización empleado afecta significativamente la potencia del Acetonido de Fluocinolona.

b) Tipo de agente antioxidante: se utilizó un agente antioxidante (metabisulfito de sodio) y un agente quelante (E.D.T.A.); se evaluó cual de los dos confería una mejor estabilidad a la formulación.

c) pH: se trabajaron 3 niveles de pH; 5.0, 6.0 y 7.0. Con esta variable se determinó el intervalo de pH en el cual se debe ajustar la solución para mantener la estabilidad de la misma.

d) Burbujeo de nitrógeno: con esta variable se determinó si aumenta la efectividad del agente antioxidante ó quelante con el desplazamiento de oxígeno.

Mencionado lo anterior la codificación de las variables quedó de la siguiente manera:

VARIABLE	NIVELES		
	(-)	(+)	
SISTEMA DE SOLUBILIZACIÓN	SISTEMA I	SISTEMA III	
TIPO ANTIOXIDANTE	E.D.T.A.	METABISULFITO DE Na	
BURBUJEO DE NITRÓGENO	SIN BURBUJEO	CON BURBUJEO	
pH DE LA SOLUCIÓN	5.0	6.0	7.0

El número de experimentos y el orden de corrida quedó como se describe a continuación:

OBSERVACIÓN	ORDEN DE CORRIDA	X ₁ SISTEMA DE SOLUBILIZACIÓN	X ₂ ANTIOXIDANTE	X ₃ pH DE LA SOLUCIÓN	X ₄ BURBUJEO DE N ₂
5	1	-1	-1	7.00	-1
13	2	-1	-1	7.00	+1
19	3	-1	+1	6.00	+1
12	4	+1	+1	5.00	+1
21	5	+1	-1	6.00	+1
17	6	-1	-1	6.00	+1
8	7	+1	+1	7.00	-1
16	8	+1	+1	7.00	+1
10	9	+1	-1	5.00	+1
23	10	+1	+1	6.00	+1
6	11	+1	-1	7.00	-1
24	12	+1	+1	6.00	-1
18	13	-1	-1	6.00	-1
15	14	-1	+1	7.00	+1
14	15	+1	-1	7.00	+1
9	16	-1	-1	5.00	+1
11	17	-1	+1	5.00	+1
4	18	+1	+1	5.00	-1
7	19	-1	+1	7.00	-1
20	20	-1	+1	6.00	-1
22	21	+1	-1	6.00	-1
2	22	+1	-1	5.00	-1
1	23	-1	-1	5.00	-1
3	24	-1	+1	5.00	-1

El tamaño de los lotes de prueba fue de 1.0 Lt

IV.8.4.2 Procedimiento de manufactura

1.- Verificar la limpieza e identificar todo el equipo y áreas a utilizar, así como verificar el equipo de seguridad, de acuerdo a las buenas prácticas y procedimientos de manufactura.

2.- En un vaso de precipitados de 1000.00 mL, adicionar 600.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; manteniendo la temperatura a 25 °C, disolver con agitación constante:

100.00 % TENSOACTIVO

Burbujear NITRÓGENO (si el diseño así lo indica).

3.- Con agitación constante adicionar a la solución del paso 2:

100.00 % SULFATO DE NEOMICINA, FEUM

100.00 % SULFATO DE POLIMIXINA B, FEUM

100.00 % ANTIOXIDANTE

Enjuagar el recipiente que contenía los antibióticos con 6.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM. Burbujear NITRÓGENO a la solución (si el diseño así lo indica).

4.- Calentar en un vaso de precipitados el (los) cosolventes a una temperatura de 54 ± 4 °C.

5.- Agregar el 100.00 % de ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; a la solución del paso 4 y mezclar hasta completa disolución, manteniendo la temperatura de la solución a 54 ± 4 °C.

*NOTA: Evitar que la temperatura sobrepase los 58 °C, y una vez disuelto el ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; dejar enfriar para evitar degradación.

6.- Con agitación constante, agregar la solución del paso No. 5, a la solución del paso 3. Enjuagar el vaso de precipitados del paso 5 con 4.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; a 54 ± 4 °C y vaciar al vaso del paso 3.

Continuar con la agitación hasta homogeneización total, burbujeando NITRÓGENO (si el diseño así lo indica)

7.- Verificar y ajustar el pH de la solución, utilizando una solución de HIDRÓXIDO DE SODIO 2.0 N y/o una solución de ÁCIDO CÍTRICO 10.0 %.

*El valor de pH a ajustar va a ser el indicado en el diseño

8.- Llevar el producto del paso 7 a un volumen de 1000.00 mL empleando la cantidad necesaria de AGUA PURIFICADA, FEUM. Mezclar hasta homogeneización total, burbujeando NITRÓGENO (si el diseño así lo indica).

9.- Transferir la solución del paso 8 a un vaso de precipitados de 1000.00 mL, filtrando a través de tela de nylon "Monyl" No. 150 (9 XX) ASTM.

10.- Con ayuda de un dosificador manual "REPITET" llenar los frascos gotero con la solución del paso 9 bajo la siguiente especificación:

VOLUMEN DE LLENADO	INTERVALO DE LLENADO
15.150 mL/Fco	15.000 - 15.300 mL/Fco

Terminada la manufactura de los lotes de prueba, muestras de éstos fueron sometidas a estabilidad acelerada durante 30 días bajo las condiciones descritas en la pagina 66.

IV.8.4.3 Variables de respuesta

La variable de respuesta a medir fue el contenido químico del Acetónido de Fluocinolona. La valoración de la actividad biológica de la Neomicina y de la Polimixina B no se realizó por las razones ya expuestas en la sección IV.8.3.3

IV.8.5 Selección del agente conservador

Con la formulación ya optimizada se procedió a la selección del conservador, se probaron los siguientes conservadores en las concentraciones que a continuación se señalan:

TIPO	NOMBRE	CONCENTRACIÓN
Ácidos Orgánicos	Benzoato de Sodio	0.09 %
Mercuriales Orgánicos	Tiomersal	0.01 %

La esterilización de la solución oftálmica se realizó en un área equipada con campana de flujo laminar de tipo horizontal. El material a utilizar y que iba a estar en contacto directo con el producto, fue esterilizado 24 horas antes de su uso.

Se fabricó un lote placebo de conservador para ser utilizado como control. La codificación de los lotes quedó como se describe a continuación:

- Lote A (Placebo de conservador)
- Lote B (Lote con tiomersal)
- Lote C (Lote con benzoato de sodio)

El tamaño de lote fue de 3 Lt.

IV.8.5.1 Procedimiento de manufactura

- 1.- Verificar la limpieza e identificar todo el equipo y áreas a utilizar, así como verificar el equipo de seguridad, de acuerdo a las buenas prácticas y procedimientos de manufactura.

2.- En un vaso de precipitados de 3000.00 mL, adicionar 1800.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; a una temperatura de 25 °C, disolver con agitación constante:

100.00 % POLISORBATO 20, NF

3.- Con agitación constante adicionar a la solución del paso 2:

100.00 % SULFATO DE NEOMICINA, FEUM
100.00 % SULFATO DE POLIMIXINA B, FEUM
100.00 % EDETATO DISÓDICO, FEUM
100.00 % CONSERVADOR*

*En el caso del lote control, no se adiciona ningún conservador.

Enjuagar el recipiente que contenía los antibióticos con 18.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM.

4.- Calentar en un vaso de precipitados el 100.00 % de PROPILENGLICOL, FEUM; junto con el 100.00 % de POLIETILENGLICOL 400, NF; a 54 ± 4 °C.

5.- Agregar el 100.00 % de ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; a la solución del paso 4 y mezclar hasta disolución total, manteniendo la temperatura de la solución a 54 ± 4 °C.

*NOTA: Evitar que la temperatura sobrepase los 58 °C, y una vez disuelto el ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA, FEUM; dejar enfriar para evitar degradación.

6.- Con agitación constante, agregar la solución del paso 5, a la solución del paso 3. Enjuagar el vaso de precipitados del paso 5 con 12.00 mL de AGUA PURIFICADA, FEUM; a 54 ± 4 °C y adicionar al vaso del paso No. 3.

Continuar con la agitación hasta homogeneización total.

7.- Verificar y ajustar (de ser necesario) el pH de la solución a 5.3 ± 0.3 , utilizando una solución de

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

HIDRÓXIDO DE SODIO 2.0 N y/o una solución de ÁCIDO CÍTRICO 10.0 %.

8.- Llevar el producto del paso 7 a un volumen de 3000.00 mL empleando la cantidad necesaria de AGUA PURIFICADA, FEUM. Mezclar hasta homogeneización total.

9.- Transferir la solución del paso 8 a un vaso de precipitados de 4000.00 mL, filtrando a través de tela de nylon "Monyl" No. 150 (9 XX) ASTM.

LOS SIGUIENTES PASOS DEBERÁN DE REALIZARSE EN
CONDICIONES ESTÉRILES

10.- Filtrar la solución obtenida en el paso 9 empleando el equipo "Millipore" equipado con prefiltro AP15 293 y con membrana GVWP 293 25 de 0.22 micras. Recibir el producto filtrado en vasos de precipitados estériles, previamente identificados. Verificar que la solución se encuentre libre de partículas extrañas.

11.- Con ayuda de un dosificador manual "REPITET" llenar los frascos gotero con la solución del paso 10 bajo la siguiente especificación:

VOLUMEN DE LLENADO	INTERVALO DE LLENADO
15.150 mL/Fco	15.000 - 15.300 mL/Fco

Finalizada la manufactura de los lotes A, B y C, se procedió a realizar la prueba de la efectividad de conservadores antimicrobianos conforme a la metodología indicada en el punto IV.6.

IV.8.6 Pruebas finales a la fórmula

Se consideraron los lotes A, B y C como fórmulas finales (ya que dieron resultados satisfactorios en la prueba de efectividad de conservadores), por lo que muestras de estos fueron sometidas a estabilidad acelerada bajo las siguientes condiciones:

CONDICIÓN	TIEMPO (MESES)				NUMERO DE FRASCOS
	0	1	2	3	
5 °C			X	X	18
25 °C	X	X	X	X	36
37 °C		X	X	X	24

Donde X:

Contenido de ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA

Contenido de NEOMICINA

Contenido de POLIMIXINA B

Observaciones Físicas

pH

Se realizó la prueba de esterilidad y la prueba de irritabilidad ocular de acuerdo a la metodología indicada en el punto IV.5 y IV.7 respectivamente.

V. - RESULTADOS.

V.1 Selección del sistema de cosolvencia para solubilización del Acetónido de Fluocinolona.

Realizados el número de experimentos establecidos por el diseño experimental se obtuvieron los resultados de intensidad de precipitado y coloración de la solución, los cuales se encuentran en la tablas No. 1 y No. 2 respectivamente. El análisis estadístico se realizó en computadora con el programa DESIGN - EXPERT versión 2.07 para D.O.S.

Los resultados del análisis estadístico bajo la condición de 25 °C con burbujeo de nitrógeno, para las variables de respuesta son los siguientes (para un modelo cuadrático):

INTENSIDAD DE PRECIPITADO

VARIABLE	COEFICIENTES
X ₁ POLIETILENGLICOL 400	2.0000
X ₂ GLICERINA	585.5057
X ₃ PROPILENGLICOL	255.3822
X ₄ AGUA	72.3793
X ₁ X ₂	- 85.9472
X ₁ X ₃	369.3339
X ₁ X ₄	- 282.4389
X ₂ X ₃	173.4674
X ₂ X ₄	- 1056.6000
X ₃ X ₄	- 613.7849

COLORACIÓN DE LA SOLUCIÓN

VARIABLE	COEFICIENTES
X ₁ POLIETILENGLICOL 400	1.0000
X ₂ GLICERINA	29.4346
X ₃ PROPILENGLICOL	15.3320
X ₄ AGUA	2.5399
X ₁ X ₂	41.7917
X ₁ X ₃	0.0000
X ₁ X ₄	6.5448
X ₂ X ₃	- 10.9470
X ₂ X ₄	38.8120
X ₃ X ₄	- 25.2866

Se efectuó la optimización del diseño para encontrar las zonas de respuesta óptima, donde se obtuvieron la gráficas No. 1, 2 y 3 que muestran la zona en donde la proporción de cosolventes es la adecuada para solubilizar el esteroide (el área que no se encuentra sombreada en las gráficas corresponde a la zona óptima).

Los niveles de cada una de las variables de respuesta en los que se trabajó fueron los siguientes:

RESPUESTA	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
Intensidad de color	0.0	1.0
Intensidad de precipitado	1.0	2.0

TABLA No. 1

**RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA DEFINIR EL SISTEMA DE COSOLVENCIA
INTENSIDAD DE FORMACION DE PRECIPITADO**

ORDEN DE CORRIDA	X_1	X_2	X_3	X_4	BURBUJEJO DE N_2				SIN BURBUJEJO DE N_2			
	PEG 400	GLICERINA	PROPILENGLICOL	AGUA	25 °C	37 °C	5 °C	5/37 °C	25 °C	37 °C	5 °C	5/37 °C
1	0,0000	0,0000	0,0200	0,9800	5	4	5	5	5	4	5	5
2	0,0000	0,0000	0,0220	0,9780	2	3	2	2	2	2	4	2
3	0,0283	0,0086	0,0073	0,9558	4	3	4	4	4	3	2	4
4	0,0425	0,0130	0,0000	0,9445	4	4	3	3	4	4	3	3
5	0,0425	0,0000	0,0110	0,9465	3	2	3	3	3	2	3	3
6	0,0850	0,0000	0,0000	0,9150	2	2	2	2	2	2	2	2
7	0,0000	0,0260	0,0000	0,9740	5	4	4	4	5	4	4	4
8	0,0200	0,0000	0,0000	0,9800	5	4	5	5	5	4	5	5
9	0,0000	0,0200	0,0000	0,9800	3	2	3	3	3	3	3	3
10	0,0000	0,0130	0,0110	0,9760	5	5	5	5	5	4	5	5

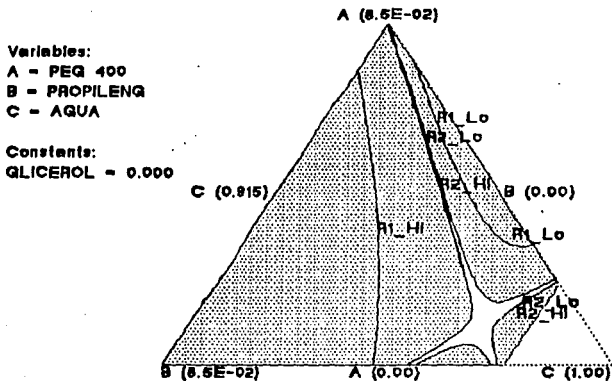
- Donde:
- 1 Sin precipitado
 - 2 Muy ligeramente precipitado
 - 3 Ligeramente precipitado
 - 4 Moderadamente precipitado
 - 5 Muy precipitado

TABLA No. 2

**RESULTADOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL PARA DEFINIR EL SISTEMA DE COSOLVENCIA
INTENSIDAD DE COLORACION DE LA SOLUCION**

ORDEN DE CORRIDA	X ₁ PEG 400	X ₂ GLICERINA	X ₃ PROPILENGLICOL	X ₄ AGUA	BURBUJEO DE N ₂				SIN BURBUJEO DE N ₂			
					25 °C	37 °C	5 °C	5/37 °C	25 °C	37 °C	5 °C	5/37 °C
					1	0,0000	0,0000	0,0200	0,9800	0	2	0
2	0,0000	0,0000	0,0220	0,9780	0	1	0	1	0	2	0	2
3	0,0283	0,0086	0,0073	0,9558	0	2	0	2	0	3	0	2
4	0,0425	0,0130	0,0000	0,9445	0	2	0	1	0	3	0	2
5	0,0425	0,0000	0,0110	0,9465	0	1	0	1	0	2	0	2
6	0,0850	0,0000	0,0000	0,9150	0	1	0	1	0	1	0	1
7	0,0000	0,0260	0,0000	0,9740	0	2	0	1	0	2	0	2
8	0,0200	0,0000	0,0000	0,9800	0	1	0	1	0	2	0	2
9	0,0000	0,0200	0,0000	0,9800	1	2	0	1	2	2	0	2
10	0,0000	0,0130	0,0110	0,9760	0	1	0	1	0	2	0	2

- Donde:
- 0 Solución sin coloración
 - 1 Solución muy ligeramente amarilla
 - 2 Solución ligeramente amarilla
 - 3 Solución moderadamente amarilla
 - 4 Solución muy amarilla

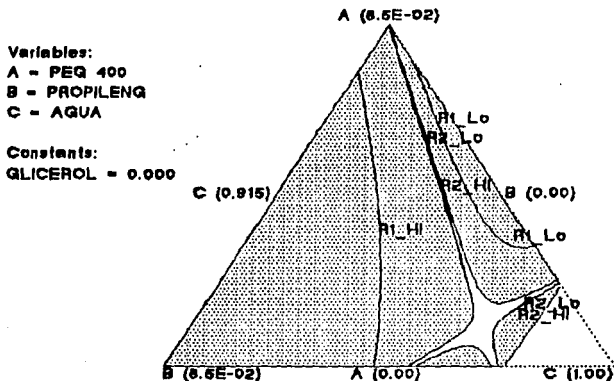


En donde:

R1: Intensidad de color.

R2: Intensidad de precipitado

GRÁFICA No. 1
 ZONA OPTIMA DE SOLUBILIZACIÓN
 (MEZCLA DE POLIETILENGLICOL 400,
 PROPILENGLICOL Y AGUA)

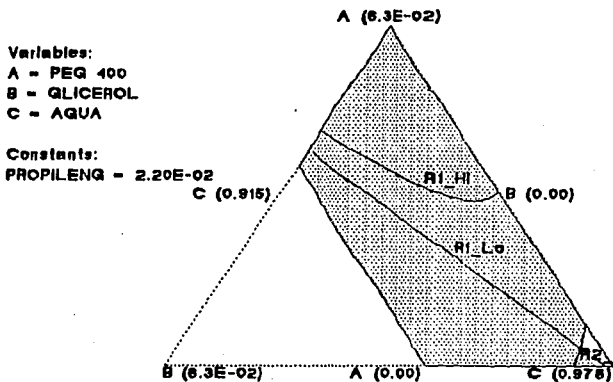


En donde:

R1: Intensidad de color.

R2: Intensidad de precipitado

GRÁFICA No. 1
 ZONA OPTIMA DE SOLUBILIZACIÓN
 (MEZCLA DE POLIETILENGLICOL 400,
 PROPILENGLICOL Y AGUA)



En donde:

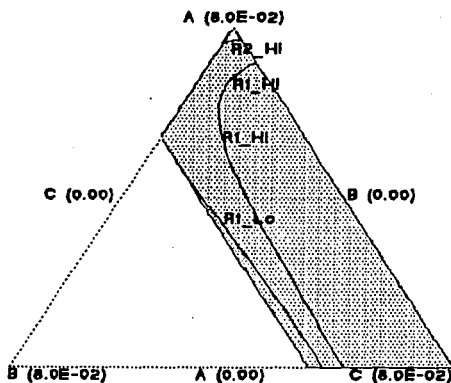
R1: Intensidad de color.

R2: Intensidad de precipitado

GRÁFICA No. 2
 ZONA OPTIMA DE SOLUBILIZACIÓN
 (MEZCLA DE PROPILENGLICOL Y AGUA)

Variables:
 A - PEG 400
 B - GLICEROL
 C - PROPILENG

Constants:
 AGUA = 0.9200



En donde:
 R1: Intensidad de color.
 R2: Intensidad de precipitado

GRÁFICA No. 3
 ZONA OPTIMA DE SOLUBILIZACIÓN
 (MEZCLA DE POLIETILENGLICOL 400 Y AGUA)

De lo anterior, se obtuvieron las siguientes proporciones de cosolventes en donde la solubilización del esteroide será la máxima:

NO. MEZCLA	POLITILENGLICOL	PROPILENGLICOL
	400	
I	4.25 %	1.10 %
II	8.50 %	-
III	-	2.20 %
IV	1.50 %	1.70 %

Las mezclas No. I, II y III corresponden a las corridas No. 5, 6 y 2 respectivamente dentro del diseño experimental planteado, mientras que la mezcla IV corresponde a un punto de prueba que se estableció al realizar el análisis estadístico del diseño y que se encuentra dentro de la zona de optimización.

V.2 Selección del agente tensoactivo para mejorar la solubilidad del Acetónido de Fluocinolona.

Se realizaron los puntos de la matriz experimental establecida, en donde los resultados obtenidos se muestran en la tabla No.3.

Los sistemas de solubilización seleccionados fueron:

SISTEMA I:
PROPILENGLICOL 1.10 %
POLIETILENGLICOL 400 4.25 %
POLISORBATO 20 1.50 %

SISTEMA II:
PROPILENGLICOL 1.10 %
POLIETILENGLICOL 400 4.25 %
POLISORBATO 80 1.50 %

SISTEMA III:
POLIETILENGLICOL 400 8.50 %
POLISORBATO 80 1.50 %

TABLA No. 3

RESULTADOS OBTENIDOS DE LA MATRIZ EXPERIMENTAL PARA SELECCION DEL AGENTE TENSOACTIVO

	NIVEL DE CONC.	NUMERO DE MEZCLA	POTENCIA DE ACETONIDO DE FLUOCINOLONA (%)				POTENCIA DE NEOMICINA (%)				POTENCIA DE POLIMIXINA B (%)			
			25 °C	37 °C	5 °C	5/37 °C	25 °C	37 °C	5 °C	5/37 °C	25 °C	37 °C	5 °C	5/37 °C
POLISORBATO 20	0,50%	I	69,00	72,00	64,00	73,00	109,00	98,00	102,00	106,00	100,00	106,00	104,00	99,00
	1,50%	I	100,00	100,00	100,00	100,00	111,00	115,00	106,00	113,00	99,00	100,00	104,00	98,00
	0,50%	II	69,00	67,00	69,00	67,00	114,00	110,00	114,00	98,00	106,00	104,00	110,00	108,00
	1,50%	II	90,00	90,00	81,00	89,00	103,00	100,00	99,00	100,00	99,00	102,00	100,00	101,00
	0,50%	III	63,00	68,00	63,00	50,00	111,00	109,00	99,00	95,00	102,00	100,00	109,00	98,00
	1,50%	III	85,00	81,00	90,00	79,00	106,00	100,00	102,00	99,00	104,00	104,00	100,00	102,00
	0,50%	IV	64,00	51,00	60,00	54,00	110,00	105,00	108,00	105,00	106,00	112,00	109,00	100,00
	1,50%	IV	85,00	79,00	84,00	84,00	98,00	100,00	99,00	97,00	109,00	114,00	100,00	102,00
POLISORBATO 80	0,50%	I	90,00	73,00	66,00	70,00	108,57	105,00	110,00	107,00	122,61	120,00	123,00	119,00
	1,50%	I	94,00	93,00	96,00	94,00	108,57	107,00	104,00	110,00	113,98	111,00	114,00	110,00
	0,50%	II	88,00	86,00	78,00	76,00	108,57	102,00	110,00	105,00	114,81	115,00	113,00	109,00
	1,50%	II	96,00	95,00	96,00	95,50	108,57	104,00	111,00	100,00	108,34	105,00	102,00	106,00
	0,50%	III	82,50	85,00	80,00	82,00	102,86	103,00	102,00	99,00	111,16	109,00	110,00	105,00
	1,50%	III	95,00	92,00	95,50	94,00	102,86	100,00	101,00	102,00	108,48	110,00	104,00	107,00
	0,50%	IV	88,00	90,50	94,00	92,00	111,43	108,00	110,00	112,00	110,50	108,00	112,00	110,00
	1,50%	IV	93,00	92,50	98,00	93,50	108,57	101,00	105,00	107,00	100,47	101,00	100,00	98,00

NOTA:

Los 8 experimentos que corresponden al laurilsulfato de sodio no se reportan debido a que durante el desarrollo experimental se presentaron incompatibilidades entre éste y los antibióticos.

V.3 Selección del agente antioxidante.

Se realizaron los puntos de la matriz experimental establecida, obteniéndose los resultados de la tabla No. 4.

Los antioxidantes seleccionados fueron:

Sistema de solubilización I + E.D.T.A., que en composición corresponde a:

PROPILENGLICOL	1.10 %
POLIETILENGLICOL 400	4.25 %
POLISORBATO 20	1.50 %
E.D.T.A.	0.10 %

Sistema de solubilización I + Metabisulfito de sodio, que en composición corresponde a:

PROPILENGLICOL	1.10 %
POLIETILENGLICOL 400	4.25 %
POLISORBATO 20	1.50 %
METABISULFITO DE SODIO	0.10 %

Sistema de solubilización III + E.D.T.A., que en composición corresponde a:

POLIETILENGLICOL 400	8.50 %
POLISORBATO 80	1.50 %
E.D.T.A.	0.10 %

Y finalmente sistema de solubilización III + Metabisulfito de sodio, que en composición corresponde a:

POLIETILENGLICOL 400	8.50 %
POLISORBATO 80	1.50 %
METABISULFITO DE SODIO	0.10 %

TABLA No. 4**RESULTADOS OBTENIDOS DE LA MATRIZ EXPERIMENTAL PARA SELECCION DEL AGENTE ANTIOXIDANTE**

SISTEMA DE SOLUBILIZACION	AGENTE ANTIOXIDANTE	CONTENIDO ACETONIDO DE FLUOCINOLONA			
		25 °C	5°C/37°C	37°C	5°C
I	E.D.T.A.	95,73%	96,52%	96,59%	95,58%
I	MET. BIS. Na.	96,23%	98,09%	97,26%	97,77%
I	FORM. SUL. Na	89,89%	95,26%	95,13%	94,64%
II	E.D.T.A.	95,18%	97,73%	96,30%	95,39%
II	MET. BIS. Na.	94,56%	97,08%	95,70%	96,18%
II	FORM. SUL. Na	89,50%	89,26%	88,13%	89,48%
III	E.D.T.A.	96,72%	98,01%	97,73%	96,98%
III	MET. BIS. Na.	99,86%	97,33%	95,98%	97,94%
III	FORM. SUL. Na	91,49%	91,63%	89,90%	91,90%

V.4 Optimización de la fórmula mediante un diseño central compuesto

Los resultados obtenidos se resumen en la tablas No. 5 y 6.

El análisis estadístico se realizó en computadora con el programa DESIGN - EXPERT versión 2.07 para D.O.S.

Los resultados del análisis estadístico en la condición de 25 °C para la potencia del Acetónido de Fluocinolona son los siguientes (para un modelo lineal):

VARIABLE	COEFICIENTES
INTERCEPTO	94.2038
X ₁ SISTEMA DE SOLUBILIZACIÓN	0.2846
X ₂ TIPO DE ANTIOXIDANTE	- 0.2013
X ₃ pH DE LA SOLUCIÓN	- 3.1044
X ₄ BURBUJEO DE NITRÓGENO	- 0.1471

En las gráficas No. 3 y 4 se puede observar el efecto que tiene el pH sobre el contenido químico del Acetónido de Fluocinolona en la solución.

Las gráficas No. 5 y 6 muestran la optimización del diseño y se puede ver la zona óptima para obtener una potencia mínima del 95.0 % del Acetónido de Fluocinolona (el área sin sombrear de la gráfica corresponde a la zona óptima de trabajo).

TABLA No. 5

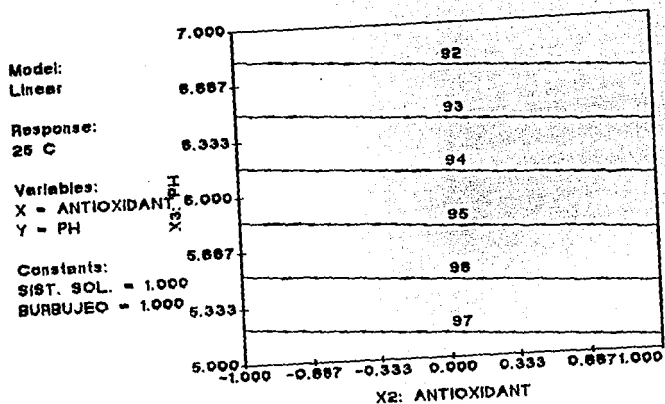
RESULTADOS DEL DISEÑO CENTRAL COMPUESTO PARA OPTIMIZACION DE LA FORMULA

No. CORRIDA	SISTEMA DE SOLUBILIZACION	INTERVALO DE pH	AGENTE ANTIOXIDANTE	BURBUJEJO DE NITROGENO	CONTENIDO DE ACETORIDO DE FLUCIOLONA (%)				
					INICIAL	5/37 °C	5 °C	37 °C	25 °C
16	SISTEMA I	5 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	97,92	99,47	96,11	91,13	96,75
23	SISTEMA I	5 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	91,30	96,47	95,85	88,76	96,28
6	SISTEMA I	6 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	93,25	96,71	94,22	85,07	96,40
13	SISTEMA I	6 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	94,04	96,25	94,55	85,80	93,96
2	SISTEMA I	7 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	93,92	91,08	93,01	74,62	88,26
1	SISTEMA I	7 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	93,89	92,49	90,98	78,69	89,15
17	SISTEMA I	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	92,15	93,49	95,72	88,72	96,13
24	SISTEMA I	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	96,43	99,35	95,84	87,80	96,69
3	SISTEMA I	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	93,70	97,94	93,87	88,18	94,48
20	SISTEMA I	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	95,22	95,69	95,48	89,58	95,63
14	SISTEMA I	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	93,21	96,14	89,44	83,76	92,00
19	SISTEMA I	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	91,45	92,16	91,84	84,22	91,40
22	SISTEMA III	5 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	95,88	94,17	97,52	98,39	98,00
9	SISTEMA III	5 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	90,57	97,42	96,83	99,23	98,58
5	SISTEMA III	6 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	94,75	96,52	97,36	86,63	97,43
21	SISTEMA III	6 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	96,31	97,52	97,03	87,67	96,92
15	SISTEMA III	7 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	92,86	89,06	92,09	75,24	89,94
11	SISTEMA III	7 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	87,90	88,69	92,58	75,04	91,29
4	SISTEMA III	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	95,26	92,48	94,57	94,18	93,21
18	SISTEMA III	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	94,96	98,24	96,34	97,98	95,41
10	SISTEMA III	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	96,65	100,20	97,11	98,16	97,40
12	SISTEMA III	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	96,06	93,86	95,84	96,13	96,34
8	SISTEMA III	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	92,06	88,54	89,51	84,09	88,68
7	SISTEMA III	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	91,47	86,65	88,20	82,87	90,66

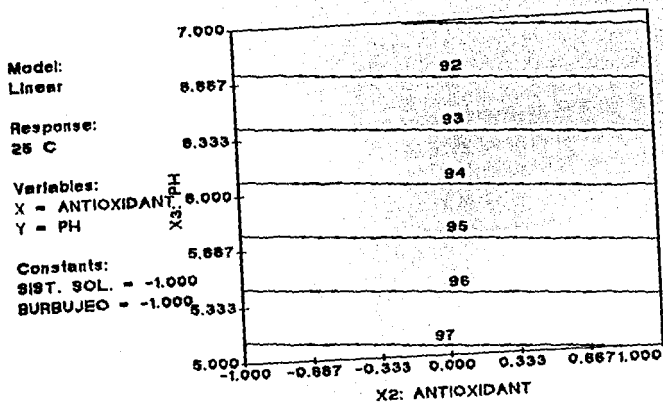
TABLA No.6

RESULTADOS DEL DISEÑO CENTRAL COMPUESTO PARA OPTIMIZACION DE LA FORMULA

No. CORRIDA	SISTEMA DE SOLUBILIZACION	INTERVALO DE pH	AGENTE ANTIOXIDANTE	BURBUJEO DE NITROGENO	pH DE LA SOLUCION				
					INICIAL	5/37 °C	5 °C	37 °C	25 °C
16	SISTEMA I	5 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	5,10	5,27	5,09	5,20	5,17
23	SISTEMA I	5 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	5,10	5,31	5,06	5,25	5,14
6	SISTEMA I	6 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	6,07	6,26	5,99	6,23	6,15
13	SISTEMA I	6 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	6,07	6,26	6,00	6,24	6,12
2	SISTEMA I	7 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	7,08	7,15	6,92	7,12	6,99
1	SISTEMA I	7 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	7,08	7,15	6,91	7,12	6,99
17	SISTEMA I	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	4,76	3,16	3,28	3,06	3,32
24	SISTEMA I	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	4,76	3,34	3,45	3,11	3,53
3	SISTEMA I	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	5,95	3,11	3,76	3,18	3,59
20	SISTEMA I	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	5,95	3,43	3,23	2,93	3,13
14	SISTEMA I	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	7,01	6,73	6,82	6,64	6,68
19	SISTEMA I	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	7,01	6,75	6,80	6,66	6,72
22	SISTEMA III	5 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	5,28	5,43	5,51	5,42	5,50
9	SISTEMA III	5 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	5,28	5,46	5,50	5,41	5,50
5	SISTEMA III	6 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	5,85	5,98	6,02	5,94	6,03
21	SISTEMA III	6 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	5,85	5,99	6,03	5,94	6,02
15	SISTEMA III	7 ± 0.3	E.D.T.A.	SI	7,14	7,19	7,25	7,15	7,22
11	SISTEMA III	7 ± 0.3	E.D.T.A.	NO	7,14	7,18	7,22	7,15	7,23
4	SISTEMA III	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	4,77	3,11	3,28	2,84	3,23
18	SISTEMA III	5 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	4,77	3,09	3,28	2,83	3,22
10	SISTEMA III	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	5,72	3,13	3,31	2,90	3,38
12	SISTEMA III	6 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	5,72	3,14	3,29	2,87	3,37
8	SISTEMA III	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	SI	7,13	6,89	6,95	6,79	6,92
7	SISTEMA III	7 ± 0.3	METABISULFITO DE SODIO	NO	7,13	6,89	6,93	6,80	6,97



GRÁFICA No. 4
 EFECTO DEL PH SOBRE LA POTENCIA DEL
 ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA
 (NIVEL ALTO DE SISTEMA DE SOLUBILIZACIÓN Y
 BURBUJEO DE N₂)



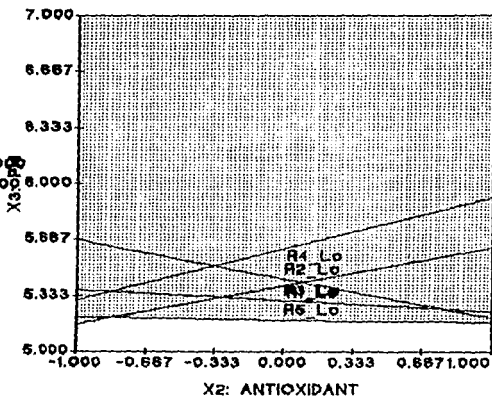
GRÁFICA No. 5
EFECTO DEL pH SOBRE LA POTENCIA DEL
ACETÓNIDO DE FLUOCINOLONA
(NIVEL BAJO DE SISTEMA DE SOLUBILIZACIÓN Y
BURBUJEO DE N₂)

R1: INICIAL
 R2: 5 °C
 R3: 25 °C
 R4: 37 °C
 R5: 5/37 °C

Constants:

SIST. SOL. = 1.000

BURBUJEO = 1.000



En donde:

R1: Potencia del Acetónido de F. inicial

R2: Potencia del Acetónido de F. a 5 °C

R3: Potencia del Acetónido de F. a 25 °C

R4: Potencia del Acetónido de F. a 37 °C

R5: Potencia del Acetónido de F. a 5/37 °C

GRÁFICA No. 6

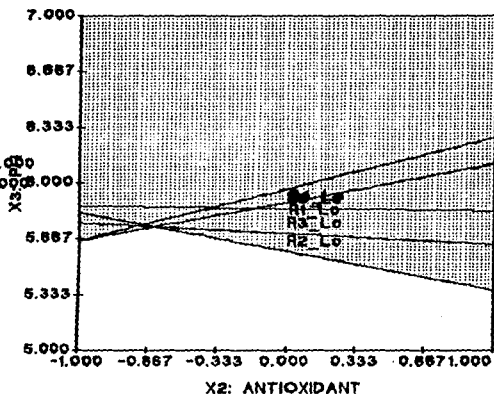
ZONA DE OPTIMIZACIÓN PARA LA FORMULACIÓN
 (NIVEL ALTO DE SISTEMA DE SOLUBILIZACIÓN Y
 BURBUJEO DE N₂)

R1: INICIAL
 R2: 5 °C
 R3: 25 °C
 R4: 37 °C
 R5: 5/37 °C

Constants:

SIST. SOL. = -1.000

BURBUJEO = -1.000



En donde:

R1: Potencia del Acetónido de F. inicial

R2: Potencia del Acetónido de F. a 5 °C

R3: Potencia del Acetónido de F. a 25 °C

R4: Potencia del Acetónido de F. a 37 °C

R5: Potencia del Acetónido de F. a 5/37 °C

GRÁFICA No. 7

ZONA DE OPTIMIZACIÓN PARA LA FORMULACIÓN
 (NIVEL BAJO DE SISTEMA DE SOLUBILIZACIÓN Y
 BURBUJEO DE N₂)

Al momento de realizar la optimización, los niveles de las variables de respuesta en los que se trabajó fueron los siguientes:

RESPUESTA	NIVEL BAJO	NIVEL ALTO
Potencia inicial	95.00 %	100.00 %
Potencia a 5 °C	95.00 %	100.00 %
Potencia a 25 °C	95.00 %	100.00 %
Potencia a 37 °C	95.00 %	100.00 %
Potencia a 5/37 °C	95.00 %	100.00 %

V.5 Selección de conservador y pruebas finales a la fórmula.

La prueba para la determinación de la efectividad de conservadores antimicrobianos para los lotes A, B y C fue satisfactoria.

La prueba de esterilidad realizada por el método directo fue satisfactoria para los tres lotes.

Los resultados obtenidos para la prueba de irritabilidad ocular fueron satisfactorios de igual manera para los tres casos, como se puede ver en las tablas No. 6, 7 y 8.

Finalmente la prueba de estabilidad a 3 meses resultó satisfactoria para los tres lotes, es importante mencionar que las determinaciones para el tercer mes no fue posible efectuarlas debido a falta de tiempo. Ver tablas No. 9, 10 y 11.

DATOS

No. CONEJO	OBSERVACIONES		
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
1	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva muy ligeramente irritada	Normal
2	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal
3	Conjuntiva muy ligeramente irritada	Normal	Normal
4	Normal	Normal	Normal
5	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal
6	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva muy ligeramente irritada	Conjuntiva muy ligeramente irritada

RESULTADO: Pasa prueba según especificaciones de FEUM Sa. Ed.

TABLA No. 7
PRUEBA DE IRRITABILIDAD OCULAR PARA EL
LOTE A

DATOS

No. CONEJO	OBSERVACIONES		
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
1	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal	Normal
2	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal
3	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal
4	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva muy ligeramente irritada	Normal
5	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada
6	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal

RESULTADO: Pasa prueba según especificaciones de FEUM 5a. Ed.

TABLA No. 8
PRUEBA DE IRRITABILIDAD OCULAR PARA EL
LOTE B

DATOS

No. CONEJO	OBSERVACIONES		
	24 HORAS	48 HORAS	72 HORAS
1	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal	Normal
2	Conjuntiva muy ligeramente irritada	Normal	Normal
3	Normal	Normal	Normal
4	Normal	Normal	Normal
5	Conjuntiva muy ligeramente irritada	Normal	Normal
6	Conjuntiva ligeramente irritada	Conjuntiva ligeramente irritada	Normal

RESULTADO: Pasa prueba según especificaciones de FEUM 5a. Ed.

TABLA No. 9
PRUEBA DE IRRITABILIDAD OCULAR PARA EL
LOTE C

TABLA No.10
RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD ACELERADA PARA EL LOTE A

		LOTE A				
		DETERMINACIONES				
TIEMPO	CONDICION	ACETONIDO DE FLUOCINOLONA	NEOMICINA	POLIMIXINA B	pH	OBSERVACIONES
	5 °C					
INICIAL	25 °C	101,25	106,00	102,00	5,35	1
	37 °C					
	5 °C					
1 MES	25 °C	102,00	111,00	104,00	5,30	1
	37 °C	100,00	113,00	102,00	5,27	1
	5 °C	102,00	110,00	100,00	5,20	1
2 MES	25 °C	101,00	109,00	100,00	5,15	1
	37 °C	101,50	112,00	101,00	5,20	1
	5 °C					
3 MES	25 °C					
	37 °C					

OBSERVACIONES:

1.- Líquido móvil, transparente, libre de partículas extrañas. Satisfactorio

TABLA No. 11
RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD ACELERADA PARA EL LOTE B

		LOTE B				
		DETERMINACIONES				
TIEMPO	CONDICION	ACETONIDO DE FLUOCINOLONA	NEOMICINA	POLIMIXINA B	pH	OBSERVACIONES
	5 °C					
INICIAL	25 °C	100,10	111,00	99,00	5,18	1
	37 °C					
	5 °C					
1 MES	25 °C	100,00	109,00	100,00	5,20	1
	37 °C	100,50	113,00	101,00	5,25	1
	5 °C	101,00	115,00	100,00	5,15	1
2 MES	25 °C	99,90	110,00	100,00	5,30	1
	37 °C	100,20	108,00	99,00	5,22	1
	5 °C					
3 MES	25 °C					
	37 °C					

OBSERVACIONES:

1.- Líquido móvil, transparente, libre de partículas extrañas. Satisfactorio

TABLA No. 12
RESULTADOS DE LA ESTABILIDAD ACELERADA PARA EL LOTE C

		LOTE C				
		DETERMINACIONES				
TIEMPO	CONDICION	ACETONIDO DE FLUOCINOLONA	NEOMICINA	POLIMIXINA B	pH	OBSERVACIONES
	5 °C					
INICIAL	25 °C	99,50	103,00	99,00	5,27	1
	37 °C					
	5 °C					
1 MES	25 °C	99,00	114,00	106,00	5,15	1
	37 °C	99,10	110,00	102,00	5,20	1
	5 °C	100,00	105,00	100,00	5,23	1
2 MES	25 °C	100,00	100,00	101,00	5,16	1
	37 °C	99,00	102,00	100,00	5,30	1
	5 °C					
3 MES	25 °C					
	37 °C					

OBSERVACIONES:

1.- Líquido móvil, transparente, libre de partículas extrañas. Satisfactorio

VI.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Con los resultados obtenidos para los coeficientes de las variables en estudio en la primera etapa del desarrollo de la formulación, se puede establecer el modelo que explica el diseño experimental propuesto, que en este caso es un modelo cuadrático y que para cada una de las variables de respuesta es el siguiente:

a) Intensidad de precipitación:

$$Y = 2.0000(X_1) + 585.5056(X_2) + 255.3822(X_3) + 72.3793(X_4) - 85.9472(X_1 X_2) + 369.3339(X_1 X_3) - 282.4389(X_1 X_4) + 173.4674(X_2 X_3) - 1056.60(X_2 X_4) - 613.7848(X_3 X_4)$$

b) Coloración de la solución:

$$Y = 1.0000(X_1) + 29.4346(X_2) + 15.3320(X_3) + 2.5399(X_4) + 41.7917(X_1 X_2) - 6.5448(X_1 X_4) - 10.9470(X_2 X_3) + 38.8120(X_2 X_4) - 25.2870(X_3 X_4)$$

En ambas ecuaciones se puede observar que la variable que tiene un mayor efecto es X_2 y que corresponde al glicerol, cuando el valor del coeficiente para cualquier variable en estudio es positivo se dice que tiene un efecto sinérgico y que a medida que aumenta este valor, mayor es el efecto. Es decir, si la composición de este cosolvente se aumentara en la mezcla, la solubilización del corticoesteroide disminuiría por el sinergismo que tiene esta variable, en donde la respuesta de intensidad de precipitación aumentaría.

Lo anterior se corrobora al observar las gráficas de optimización, en donde las zonas óptimas se obtienen a composiciones muy pequeñas o en su defecto sin la presencia del glicerol.

Con lo anteriormente expuesto, es la razón por la cual se eliminó al glicerol como cosolvente, ya que eliminándolo se elimina su efecto sinérgico y de esta

forma, la respuesta obtenida en valor numérico es pequeña.

Algo que es muy importante mencionar es que de las diferentes zonas de optimización obtenidas en el análisis del diseño, la que presentó más área fue la que correspondía a la mezcla de propilenglicol - polietilenglicol 400 - agua (gráfica No. 1), y donde finalmente esa fue la mezcla establecida en la fórmula final.

Se sabe que muchos fármacos de características no polares presentan una solubilidad muy pobre en agua, en donde esa solubilidad puede ser aumentada por la utilización de solventes miscibles en agua y en donde además el fármaco es soluble. Este proceso es conocido como cosolventancia y los solventes utilizados en combinación para aumentar la solubilidad son conocidos como cosolventes. Se ha propuesto que el sistema de cosolventes trabaja disminuyendo la tensión superficial entre la predominante solución acuosa y el soluto hidrofóbico. Trabajos recientes han supuesto que algunos grupos (amidas por ejemplo) adsorben al soluto hacia la interface con el agua, disminuyendo así la tensión superficial entre el soluto/agua, y que una porción restante del cosolvente es dirigida hacia la fase acuosa, de tal suerte que la solubilidad de un fármaco en mezclas de solventes es función de la composición de dicha mezcla, ya que si la cantidad del cosolvente es muy pequeña, la cantidad de agua existente es mayor impidiendo la solubilización del fármaco.

La explicación anteriormente expuesta es por la razón de que se observó que con el paso del tiempo el corticoesteroide precipitaba en la solución debido a su insolubilidad en agua y que además la proporción que en la que se podían utilizar los cosolventes es restringida; por ese motivo hubo necesidad de utilizar un agente tensoactivo.

En la siguiente fase se pudo observar que los polisorbatos 20 y 80 fueron los que dieron mejores resultados, no así el laurilsulfato de sodio, que al

entrar en contacto con los antibióticos, estos precipitaban.

Es importante señalar que de los dos niveles de concentración utilizados, la concentración alta fue la seleccionada para los dos tensoactivos, en donde estas concentraciones están por arriba de la concentración crítica micelar, siendo este punto en donde las moléculas del tensoactivo se agregan en forma de micelas. La importancia de esto radica en el hecho de que los compuestos poco o insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos pueden disolverse dentro de las micelas, en otras palabras, están en solución en un medio predominantemente acuoso.

Con la incorporación de este agente tensoactivo se logró la completa solubilización del corticoesteroide, y aún más importante, que no precipitó con el paso del tiempo.

Es importante señalar que este tipo de agentes tensoactivos son los más recomendados para solubilizar corticoesteroides, en donde además son los únicos reconocidos por la Food and Drug Administration (FDA) de entre los diferentes agentes tensoactivos para ser utilizados en soluciones oftálmicas(9).

El estudio de la estabilidad de la solución se centró básicamente en el Acetonido de Fluocinolona y la razón fue porque éste es menos estable en solución, a diferencia de la Neomicina y Polimixina B las cuales son más estables.

Esto se puede observar con gran claridad en la tabla No.3, donde mientras que el Acetonido de Fluocinolona se ve significativamente afectado en su potencia por las diferentes condiciones a las que se sometió la solución durante el estudio, la Neomicina y Polimixina permanecieron sin cambios significativos en su potencia.

Por lo anterior, la selección del agente antioxidante fue una etapa crítica, ya que este

componente dentro de la formulación iba a conferir dicha estabilidad.

Con los resultados obtenidos en esta etapa, los cuales se encuentran en la tabla No. 4 se puede ver con claridad que el formaldehído sulfoxilato de sodio no contribuye en gran manera a la estabilidad del corticoesteroide (el contenido químico obtenido está por debajo del 90.0 %), fue por esta la razón por la que este antioxidante se eliminó.

En lo que respecta al metabisulfito de sodio y E.D.T.A., estos arrojan resultados satisfactorios (el contenido químico obtenido para ambos casos estuvo por arriba del 90.0 %), resultando así en buenos candidatos para ser utilizados, de tal suerte que fueron seleccionados conjuntamente con los sistemas de solubilización I y III.

En la etapa de optimización de la fórmula, los resultados obtenidos de los efectos para cada una de las variables en estudio, demuestran que el factor pH tiene un efecto significativo sobre la variable de respuesta (potencia del Acetónido de Fluocinolona); posteriormente le sigue el tipo de sistema de solubilización utilizado. Es importante mencionar que este efecto es de tipo antagónico, es decir, que al establecer estas variables en sus niveles altos, la potencia del corticoesteroide tenderá a disminuir.

Como se puede observar en las gráficas No. 4 y 5, al disminuir el pH de la solución, la potencia del corticoesteroide aumenta, por lo que entonces a valores de pH ácidos aumenta la estabilidad del activo. En estas mismas gráficas se puede observar que existe una tendencia a obtener potencias altas si se utiliza el agente antioxidante en su nivel bajo, el cual corresponde al E.D.T.A.

Cabe mencionar que las soluciones en las cuales se utilizó metabisulfito de sodio como antioxidante, sufrieron cambios significativos de pH a lo largo del estudio, inclusive algunas se salieron de las

especificaciones; para el E.D.T.A. las soluciones no sufrieron cambios de pH.

En las gráficas No. 6 y 7 que corresponden a la optimización de la formulación, se puede ver que la zona de optimización es más amplia en la gráfica No.6. En esta gráfica las variables correspondientes al sistema de solubilización y burbujeo de nitrógeno se mantienen en sus niveles bajos.

El sistema de solubilización en este nivel corresponde al sistema I, el cual está compuesto por:

PROPILENGLICOL	1.10 %
POLIETILENGLICOL 400	4.25 %
POLISORBATO 20	1.50 %

Para el burbujeo de nitrógeno, su nivel bajo corresponde a no burbujear nitrógeno a la solución.

En la gráfica No. 7 la zona de optimización es muy reducida, aquí las variables correspondientes al sistema de solubilización y burbujeo de nitrógeno se mantienen en sus niveles altos.

Con todos estos datos se puede establecer que las condiciones óptimas de la formulación son las siguientes:

- a) el pH de la solución no debe exceder de 5.6 para tener una solución estable y con una potencia mínima del 95.0 % de Acetonido de Fluocinolona.
- b) el agente antioxidante a utilizar debe ser E.D.T.A., así el corticoesteroide se mantendrá estable en solución y el pH de esta no sufrirá cambios significativos.
- c) No es significativo el burbujear nitrógeno a la solución para evitar la degradación del principio activo por efecto del oxígeno

d) El sistema de solubilización a utilizar es el siguiente:

PROPILENGLICOL	1.10 %
POLIETILENGLICOL 400	4.25 %
POLISORBATO 20	1.50 %

La determinación de la actividad antimicrobiana para los dos conservadores probados resultó satisfactoria, lo cual indica que cualesquiera de los dos puede ser utilizado. Es importante señalar que el lote placebo también dió resultados satisfactorios, lo que indica que la formulación puede prescindir de algún conservador, esto porque los antibióticos presentes en la formulación tienen actividad antimicrobiana.

La prueba de esterilidad para los A, B y C resultó satisfactoria, lo cual indica que las tres formulaciones cumplen dicho requisito.

La prueba de irritabilidad ocular fue igualmente satisfactoria para los lotes A, B y C, lo cual demuestra que las tres formulaciones no son irritantes para las membranas oculares.

Con todo lo anterior, se llega finalmente a las siguientes fórmulas:

FORMULA I

Acetónido de Fluocinolona, FEUM.	0.015	g
Sulfato de Neomicina, FEUM		
equivalente a:	0.385*	g
de Neomicina base, FEUM		
Sulfato de Polimixina B, FEUM		
equivalente a :	1.100*	MU
de Polimixina B base, FEUM		
Propilenglicol, FEUM	1.100	g
Polietilenglicol 400, NF	4.250	g
Polisorbato 20, NF	1.500	g
Edetato Disódico, FEUM	0.100	g
Agua Purificada, FEUM cbp	100.000	mL

* Contiene un 10 % de exceso

FORMULA II

Acetónido de Fluocinolona, FEUM.	0.015	g
Sulfato de Neomicina, FEUM		
equivalente a:	0.385*	g
de Neomicina base, FEUM		
Sulfato de Polimixina B, FEUM		
equivalente a :	1.100*	MU
de Polimixina B base, FEUM		
Propilenglicol, FEUM	1.100	g
Polietilenglicol 400, NF	4.250	g
Polisorbato 20, NF	1.500	g
Edetato Disódico, FEUM	0.100	g
Tiomersal, FEUM	0.010	g
Agua Purificada, FEUM cbp	100.000	mL

* Contiene un 10 % de exceso

FORMULA III

Acetónido de Fluocinolona, FEUM.	0.015	g
Sulfato de Neomicina, FEUM		
equivalente a:	0.385*	g
de Neomicina base, FEUM		
Sulfato de Polimixina B, FEUM		
equivalente a:	1.100*	MU
de Polimixina B base, FEUM		
Propilenglicol, FEUM	1.100	g
Polietilenglicol 400, NF	4.250	g
Polisorbato 20, NF	1.500	g
Edetato Disódico, FEUM	0.100	g
Benzoato de sodio, FEUM	0.090	g
Agua Purificada, FEUM	cbp	100.000 mL

* Contiene un 10 % de exceso

VII.- CONCLUSIONES.

1. Se proponen 3 formulaciones que cumplen con todos los requerimientos especificados para una solución oftálmica, los cuales son que sea química y biológicamente estable, que sea estéril y que no sea irritante para las mucosas del ojo.
2. El pH de la solución para ayudar a su estabilidad debe ser menor de 5.60 por lo cual se recomienda trabajarlo en un intervalo de 5.25 ± 0.25 .
3. El E.D.T.A. contribuye a mejorar la estabilidad del Acetónido de Fluocinolona en solución sin que ésta sufra modificaciones de pH.
4. El Benzoato de Sodio y el Tiomersal resultaron ser eficaces para mantener la esterilidad de la solución, aunque existe la alternativa de que ésta pueda prescindir de los conservadores sin que haya riesgo de contaminación microbiana.
5. Las fórmulas propuestas demuestran ser física, química y microbiológicamente estables.
6. Las fórmulas propuestas pueden ser escaladas a un tamaño de lote a nivel producción.

VIII.- GLOSARIO.

ΔH_{fus}	Calor molar de fusión
ΔG_{fus}	Energía molar de fusión
m_2	Molalidad de la solución
w_1	Masa del disolvente
w_2	Masa del soluto
M_1	Masa molar del disolvente
M_2	Masa molar del soluto
K_f	Constante crioscópica
ΔT	Descenso del punto de congelación
π	Presión osmótica
n_1	Moles del disolvente
n_2	Moles del soluto
M_2	Molaridad de la solución
i	Factor de disociación
C_n	Concentración expresada en g/Lt
E_{NaCl}	Equivalente de cloruro de sodio
R	Constante de los gases
T	Temperatura

IX.- BIBLIOGRAFÍA.

(1) Dalma Kende Alejandro., Mata Felipe., El Acetonido de Fluocinolona en el tratamiento de diversos cuadros patológicos oculares., Medicina Revista Mexicana, 50 (1090), 413 - 417 Agosto (1970).

(2) Diez Gutiérrez Sergio., Experiencia con un nuevo corticoide de uso oftálmico., Medicina Revista Mexicana, 50 (1086), 277 - 280 Junio (1970).

(3) Sánchez Nuñez H., Fluocinolone Acetonide in ophthalmology., Syntex Institute of Clinical Medicine., Archivos de Investigación Clínica. 1961.

(4) Blecher Louis., The Formation of the International Excipients Council., Pharmaceutical Technology International., 66 - 67 June 1991.

(5) Román Fernando D., Innovación y Desarrollo Farmacéutico., Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C., México 1990. Pags 271 - 287.

(6) Stella Valentino J. Ph D., Evolution of Formulation Practices., Drug Development and Industrial Pharmacy, 16 (18), 2627 - 2633 (1990).

(7) Hernández J. Gabriel., Seminario de Diseño de Experimentos., Septiembre 1991. Impartido en Syntex S.A. de C.V.

(8) Patel Jitendra P., Marsh Kennan., Carr Linda & Nequist George., Factorial designs in ophthalmic formulation development of Enalkiren., International Journal of Pharmaceutics, 65 (1990) 195 - 200.

(9) Adams John., Anderson Joan., Bailey Leonard., Schwartz Joseph B., Remington Farmacia., Ed. Médica Panamericana., Argentina 1987. Pags 413 - 419, 1604 - 1605, 1631 - 1632, 2005 - 2006, 2106 - 2121.

- (10) González Castro Irma., Diseño de una solución oftálmica estéril con gramicidina, neomicina y polimixina., TESIS Q.F.B. U.N.A.M., México 1973. Pags 9 - 20, 24 - 28.
- (11) Helman José., Farmacotécnica Teórica y Practica., Cia Editorial Continental., México 1986. Pags 1485 - 1497, 1511 - 1518, 1953 - 1960 Tomo V y VI.
- (12) Información Técnica ISP (México), S.A. de C.V.
- (13) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos., 5a. Ed. 1988. Pags 194 - 195, 954 - 955.
- (14) The United States Pharmacopeia XXI., The United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A. 1984. Pags 1138 - 1139, 1151, 1156 - 1160, 1163.
- (15) British Pharmacopeia., United Kingdom., 1993. Pags 285 - 286, 736 - 738.
- (16) Hernández Covarrubias Carlos Miguel., Problemas tecnológicos más frecuentes que se presentan dentro de la industria farmacéutica., TESIS Q.F.B. F.E.S. - C, México 1992. Pags 41 - 42, 53 - 57.
- (17) Chemical Stability of Pharmaceutical. A Handbook of Pharmacist., Connors Kenneth A., Amidon Gordon L., Stella Valentino J., John Wiley & Sons Inc., U.S.A. 1986. Pags 37 - 42.
- (18) The National Formulary XVIII., The United States Pharmacopeial Convention Inc., U.S.A. 1994. Pags 1945 - 1947.
- (19) Raymond Chang., Fisicoquímica con aplicaciones a sistemas biológicos., Cia. Editorial Continental. S.A. de C.V., México, 1987. Pags 225 - 238.
- (20) Castellan Gilbert W., Fisicoquímica., SITESA., México 1987. Pags 301 - 312.

(21) Remington's Pharmaceutical Sciences., Abdou Hamed M., Amerson Ann B., Connors Kenneth A., Roja Frank., 16 Ed. U.S.A. 1980. Pags 1562 - 1563, 1406 - 1412.

(22) Warner Murray., Adverse Reactions to Drug Formulation Agents; A Handbook of Excipients., Marcel Dekker, Inc., U.S.A. 1989. Pags 392 - 395.

(23) Nayak A. S., Cutie A.J., Jochsberger T & Kay A.I., The Effect of Various Additives on The Stability of Isoproterenol Hydrochloride Solutions., Drug Development and Industrial Pharmacy, 12 (4), 589 - 601 (1986).

(24) Berg Thomas F & Niebergall Paul J., Glucose Oxidase as a Pharmaceutical Antioxidant., Drug Development and Industrial Pharmacy, 18 (16), 1813-1822 (1992).

(25) Ernerot Lennart & Läkemedel Astra., Formulation Factors; Drugs Applied Parenterally., Formulations and Preparation of Dosage Forms., Elsevier/North Holland Biomedical Press. U.S.A. 1977. pag 67 - 73.

(26) Takacsi Nagy G., Interaction between sterile medicaments and their immediate packaging materials: sorption, extraction and permeation., International Polymer Science and Technology, 16 (8), 24 - 28 (1989).

(27) Kaminsky Aaron & Gaidamak., Ensayo terapéutico: Acetónico de Fluocinolona., El Día Médico, 2146 - 2147 Octubre 1962.

(28) Physical-Chemical Data., File Number 14., Syntex Corporation 1985

(29) Analytical Profiles of Drug Substances., Florey Klaus., Academic Press Inc., U.S.A. 1979. Pags 399 - 403, 424 - 425 Tomo VIII.

(30) Manufacturing Quality Assurance., File No. 35., Syntex Corporation.

(31) Handbook of Pharmaceutical Excipients., American Pharmaceutical Association and The Pharmaceutical Society of Great Britain., U.S.A. 1983. Pags 108 - 110, 123 - 124, 209 - 213, 225 - 227, 241 - 242, 261 - 262, 273 - 274, 325 - 327.

(32) Wells James Y., Pharmaceutical Preformulation, The Physicochemical Properties of Drug Substances., Ellis Hoerwood Limited., England 1988. Pag 171.

(33) Clarke's Isolation and Identification of Drugs., Moffat A.C., Jackson J.V., Moss M.S., Widdop B., The Pharmaceutical Press., Great Britain 1986. Pags 395 - 396, 487, 610.

(34) Windsor Cutting., Cutting's Handbook of Pharmacology., The actions and uses of drugs., Appleton-Century-Crofts., U.S.A. 1972. Pags 334 - 349.

(35) Lachman Leon., Liberman Herbert A., Kaing Joseph L., The Theory and Practice of Industrial Pharmacy., LEA & FEBIGER Inc., Third Ed., U.S.A. 1986. Pags 457 - 466.

(36) Grubstein B & Milano E., Stabilization of Epinephrine in a local anesthetic injectable solution using reduced levels of sodium metabisulfite and E.D.T.A., Drug Development and Industrial Pharmacy, 18 (14), 1549 - 1566 (1992).

(37) Martin Alfred., Swarbrick James., Cammarata Arthur., Physical Pharmacy., Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences., Lea & Febiger., U.S.A. 1983. Pags 379 - 392.

(38) The United States Pharmacopeia XXII., The United States Pharmacopeial Convention, Inc., U.S.A. 1989. Pags 1488 - 1493.