

Disciplina de fizică farmaceutică (cond.: șef de lucrări B. Barabás) și Disciplina de tehnică farmaceutică (cond.: conf. L. Ádám, doctor farmacist) ale I.M.F. Tîrgu Mureș

CONTROLUL BACTERIOLOGIC AL EMULSIILOR FARMACEUTICE PRIN METODA IMPRĂȘTIERII RADIĂȚIEI LASER

M. Olariu, Zamfira Csath

Aplicarea metodei împrăștierii luminii monocromatice la studiul emulsiilor care conțin adeseori și microorganisme vii se poate face ușor, avînd la dispoziție rezultatele obținute recent (1—7), prin aplicarea acestei metode la studiul suspensiilor apoase de bacterii. Dacă din punct de vedere experimental metoda de lucru și aparatura rămîn aceleași, aspectul teoretic este totuși

diferit, deoarece în cazul emulsiilor, la fenomenul de împrăștiere a luminii participă pe lângă microorganismele existente și particulele componente ale emulsiei. Fiind vorba de particule cu parametri de împrăștiere diferiți (dimensiune, formă, indice de refracție), intensitatea luminii împrăștiată la diferite unghiuri de observație — $I(\theta)$ — nu mai poate fi calculată după modelul cunoscut (1, 7). O primă aproximare ar fi aceea de-a face o însumare a celor două efecte datorate celor două categorii de particule existente. Se ajunge astfel la o relație mai complicată, în care din nefericire factorul de formă total se calculează foarte greu, dat fiind faptul că dimensiunea particulelor componente ale emulsiei este foarte variabilă, calculul efectului de interferență internă devenind astfel foarte aproximativ (8). Acest aspect al problemei nu micșorează însă posibilitățile aplicative ale rezultatelor experimentale.

Pentru înregistrarea diagramelor de împrăștiere $I(\theta)$ am folosit o instalație construită după modelul Wippler-Scheibling (9, 10), adaptată pentru utilizarea unui laser He-Ne, model LG—750.1 de fabricație I.F.A. București. Observațiile au fost făcute în lumina vertical polarizată, la 6328 Å. Emulsiile au fost preparate cu un emulgator complex format din tenside neionice de tip Tween și Span, la un HLB optim cu valoarea 11, folosind ulei de parafină în proporție de 20 %. Prepararea s-a făcut în condiții aseptice cu componente sterilizate, utilizând un agitator electric clasic (11, 12). În probele analizate gradul de dispersie al emulsiei a fost de aproximativ $18 \cdot 10^9$ particule/cm³, acesta fiind determinat prin numărare la microscop.

În fig. nr. 1 prezentăm diagramele de împrăștiere pentru o emulsie care a fost infestată cu germeni de *Escherichia coli*. Curba „b” a fost înregistrată imediat după infestare, iar curba „a” după 24 de ore. Se observă o creștere în intensitatea împrăștiată pentru toate unghiurile de observație. Acest fenomen poate fi explicat numai admitând faptul că în acest interval de timp în proba cercetată a avut loc o înmulțire a bacteriilor introduse. Avem deci la dispoziție o metodă rapidă prin care putem urmări variația numărului de bacterii în emulsia studiată. Evident aceasta este valabilă numai în condiția ca emulsia să fie stabilă în timp. Stabilitatea emulsiilor folosite am verificat-o înregistrând diagrame pentru emulsiile sterile la intervale de timp diferite. Stabilitatea curbei este foarte bună, fapt care poate fi remarcat și în diagramele prezentate în figurile nr. 2 și nr. 3.

În fig. nr. 2, curba „e” a fost înregistrată pentru o emulsie sterilă, iar curba „e+b” pentru o emulsie în care s-au introdus bacterii la o concentrație de $6 \cdot 10^7$ bacterii/cm³. Concentrația emulsiei a fost aceeași în ambele probe. În fig. nr. 3 avem înregistrată în plus o curbă „b”, pentru o probă în care am avut o suspensie de bacterii la aceeași concentrație cu proba „e+b”. Curbele se diferențiază net, ceea ce înseamnă că pe baza unei diagrame trasate anterior putem observa ușor dacă o emulsie farmaceutică conține sau nu microorganisme.

Din figurile prezentate mai sus se observă că sensibilitatea maximă a metodei corespunde pentru unghiuri de observație mici (40° — 60°). Ca atare, în experiențele prezentate mai jos, în care am lucrat la unghi de observație fix, am ales pentru θ valoarea de 50° .

Din diagramele prezentate mai sus putem obține numai informații calitative în ceea ce privește controlul bacteriologic al unei emulsii farmaceutice. Pentru a cunoaște exact numărul de microorganisme existent în emulsie la un moment dat, am recurs la trasarea unor curbe de etalonare. Pentru aceasta am preparat o serie de probe, conținând diferite cantități de bacterii și cu o concentrație de emulsie constantă. În fig. nr. 4 am reprezentat intensitatea împrăștiată de aceste probe în funcție de numărul de microorganisme existent. Curba de etalonare obținută ne permite să determinăm imediat

concentrația de microorganisme dintr-o emulsie oarecare, măsurând intensitatea împrăștiată la $\theta=50^\circ$. Germenii folosiți au fost din specia *Candida*.

Avînd posibilitate să urmărim în timp creșterea sau micșorarea numărului de germeni într-o emulsie farmaceutică, putem studia ușor efectul pe care-l au diferiții conservanți asupra unor microorganisme existente în emulsia respectivă. În acest scop am însămintat cu germeni din specia *Candida* mai multe emulsii, care ulterior au fost tratate cu diferiți conservanți în dozele uzuale. Una din probe a rămas martor. Măsurînd intensitatea împrăștiată de aceste probe la anumite intervale de timp, în baza curbei de etalonare din fig. nr. 4, putem urmări evoluția numărului de germeni din probă. Astfel, în fig. nr. 5 putem remarca o evoluție diferită a numărului de microorganisme din proba martor, față de probele tratate cu conservanți. Mai mult, se poate observa ușor eficacitatea fiecărui conservant în parte. Panta dreptelor obținute este invers proporțională cu eficacitatea conservantului respectiv. Dacă pentru proba martor și proba numărul 1 microorganismele continuă să se înmulțească — cu viteze diferite — pentru probele 2, 3, 4 și 5 numărul de bacterii vii începe să scadă încă din prima zi. Rezultă că acești conservanți au o eficacitate mult mai mare decît cel corespunzător probei 1, cel mai bun fiind acela din proba 2. Rezultatele comparative obținute pentru conservanții folosiți sînt în concordanță cu datele din literatură (13, 14, 15), metoda avînd avantajul că permite o măsurare rapidă și continuă a numărului de bacterii din probele de cercetat.

Efectuînd experiențe cu specii de microorganisme diferite am constatat că metoda permite și o evaluare diferențiată a eficacității conservanților în funcție de specia de microorganisme introdusă în emulsie. În fig. nr. 6 curba „a” corespunde unei probe martor, iar curba „b” unei probe care conține conservant (acid sorbic 0,1%), specia folosită fiind de data aceasta *Escherichia coli*. Analiza curbelor arată că efectul conservantului apare abia după aproximativ 5 zile, ceea ce înseamnă că această specie este mult mai rezistentă decît *Candida* la acțiunea acestui conservant. Intervalul de timp după care este oprit procesul de înmulțire celulară depinde nu numai de specia de microorganisme existentă, ci depinde și de o serie de factori de mediu cum ar fi temperatura, calitățile nutritive ale mediului etc. Oricum, metoda permite pentru fiecare caz în parte stabilirea precisă a momentului în care activitatea microorganismelor respective este blocată, moment care depinde evident și de cantitatea de conservant introdusă în probă.

Concluzii

Metoda de lucru discutată mai sus prezintă avantajul de-a fi mai rapidă, mai comodă și uneori mai precisă decît metodele clasice, într-o serie de determinări, ca:

- stabilirea purității bacteriologice a emulsiilor farmaceutice în baza unei diagrame trasate anterior,
- aprecierea cantitativă a microorganismelor care există într-o emulsie,
- urmărirea continuă a numărului de microorganisme din emulsia studiată,
- stabilirea eficacității diferiților conservanți,
- stabilirea intervalului de timp după care microorganismele existente devin inactice,
- stabilirea cantităților de conservanți necesare pentru inactivarea în timp util a microorganismelor din emulsia respectivă.*

Sosit la redacție: 5 octombrie 1972.

* Aducem pe această cale mulțumirile noastre disciplinei de microbiologie care ne-a asigurat permanent culturile de bacterii necesare experiențelor efectuate.

M. OLARIU, ZAMFIRA CSATH: CONTROLUL BACTERIOLOGIC AL EMULSIILOR FARMACEUTICE PRIN METODA IMPRĂȘTIERII RADIAȚIEI LASER

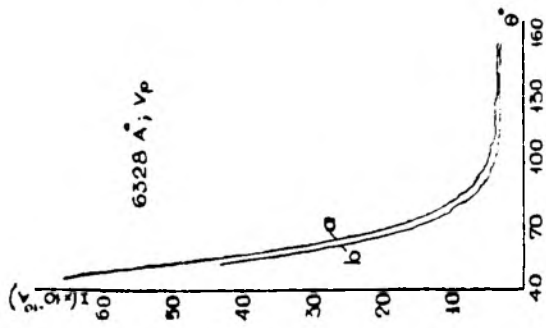


Fig. nr. 1: Diagrama de împrăștiere pentru o emulsie infestată cu germeni din specia *Escherichia coli*. a înregistrare după 24 de ore; b înregistrare în momentul infestării

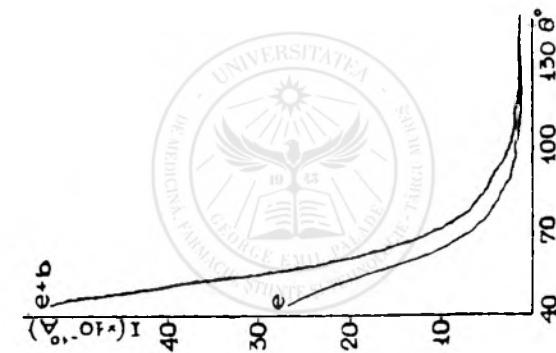


Fig. nr. 2: e - emulsie sterilă; e - b aceeași emulsie conținând germeni de *Escherichia coli* în concentrație de $6 \cdot 10^7/\text{cm}^3$

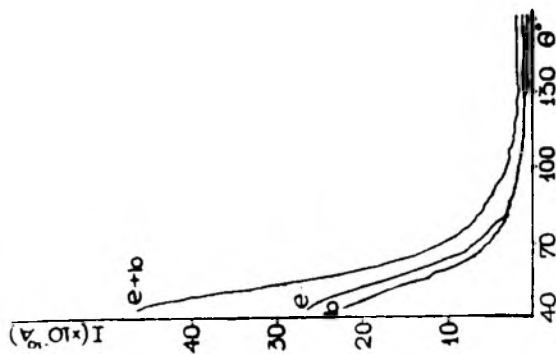


Fig. nr. 3: e emulsie sterilă. e + b = emulsie conținând germeni de *Escherichia coli* în concentrație de $6 \cdot 10^7/\text{cm}^3$; b = suspensie de *Escherichia coli* având concentrația de $6 \cdot 10^7/\text{cm}^3$

M. OLARIU, ZAMFIRA CSATH: CONTROLUL BACTERIOLOGIC AL EMULSIILOR FARMACEUTICE PRIN METODA IMPRĂȘTIERII RADIAȚIEI LASER

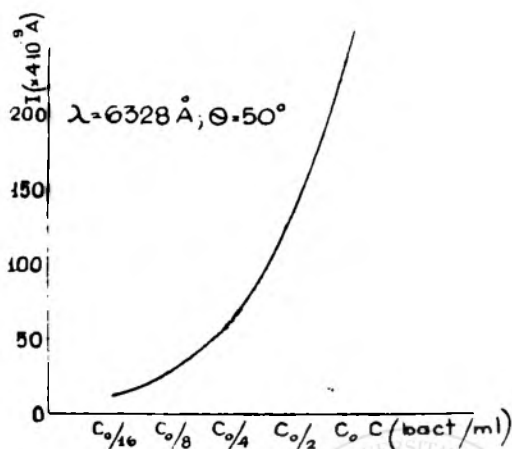


Fig. nr. 4: Curbă de etalonare pentru controlul cantitativ al concentrației de microorganisme. $C_0 = 0.9 \cdot 10^8 \text{ cm}^3$

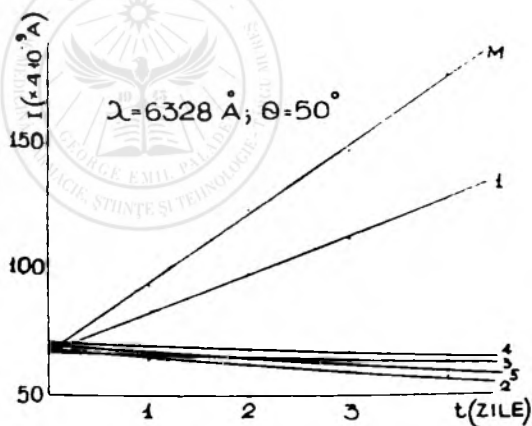


Fig. nr. 5: M = proba martor; 1 = Nipagin + Nipazol 1%; 2 = Fenosept 0.002%; 3 = Tiomersal 0.005%; 4 = Acid benzoic 0.1%; 5 = Acid sorbic 0.1%

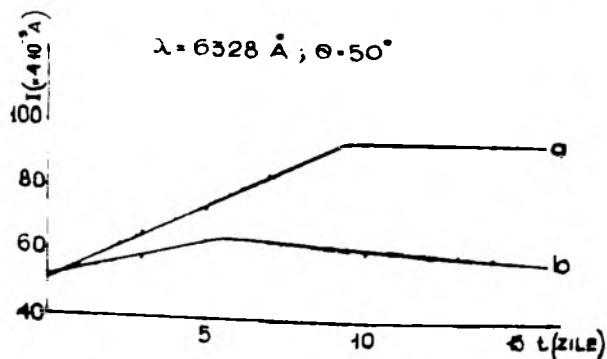


Fig. nr. 6: a — probă fără conservant; b — probă cu conservant — acid sorbic

Bibliografie

1. WYATT P. J.: Appl. Optics (1968), 7, 1879; 2. WYATT P. J.: Nature (1970), 226, 277; 3. WYATT P. J.: Nature (1970), 226, 5242; 4. *** „Science Spectrum“, Application Note, 1972; 5. MULLANEY P. F., DEAN P. N.: Biophysical Journal (1970), 10, 764; 6. BERKMAN R. M., WYATT P. J.: Appl. Microbiology (1970), 20, 510; 7. OLARIU M., PÉTER M., FILEP V.: Rev. Med. (1972), 2, 172; 8. KERKER M.: The Scattering of Light, Academic Press, New York, 1969; 9. WIPPLER C., SCHEIBLING G.: J. Chim. Phys. (1954), 51, 201; 10. GHÎȚĂ L. GHÎȚĂ C.: Studii și cercetări de fizică (1963), 5, 725; 11. CSATH Z., NAGY M.: Eficiența unor metode de control în verificarea calității emulsiilor. U.S.S.M. Filiala Mureș, Secția farmacie. 24 februarie 1972; 12. CSATH Z., NAGY M.: Utilizarea tensidelor la prepararea emulsiilor. Simpozion Farmacie, Tîrgu Mureș, 29 aprilie 1972; 13. HESS H.: Pharm. Acta Helv. (1964), 39, 721; 14. PATEL N., ROMANOWSKI J.: J. Pharm. Sci. (1970), 59, 372; 15. CSATH Z., HORVÁTH G.: Rev. Med. (1972), 3.

