

12
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
ZARAGOZA

CONTROL AMBIENTAL DE ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS EN UNA PLANTA FARMACEUTICA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
Rocio Flores Santamaria

Asesor: Q.F.B. ALEJANDRO ALCANTARA PINEDA

LIBRO CON
FALLA DE ORIGEN



MEXICO, D. F.

1991



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

El hecho que los antibióticos beta lactámicos desencadenen respuestas inmunes que pueden llegar a ser mortales, los hace objeto de un estricto control sanitario durante todo su proceso: síntesis, elaboración de medicamentos, distribución, venta y administración en todo el mundo.

En México la Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura (CIPAM) sugiere el establecimiento de procedimientos especiales que permitan vigilar estrictamente los productos conteniendo agentes sensibilizantes a bajas concentraciones provenientes de otros productos, para prevenir la contaminación [A]. Por ello y considerando que durante la manufactura de antibióticos beta lactámicos, se realizan operaciones en las que el principio activo se puede esparcir en el ambiente provocando contaminación a productos que se trabajan en áreas adyacentes, los laboratorios donde se manejen dichos antibióticos deben de contar con métodos rápidos, específicos y sensibles a los beta lactámicos para evitar que contamine áreas no beta lactámicas y es precisamente este hecho el que da origen al presente estudio.

Las bases fisiológicas y legales que fundamentan el diseño del método de muestreo para detectar ampicilina y cefalexina en una planta farmacéutica son:

1) Procesos inmunológicos: mecanismo de sensibilización a las penicilinas; tipos de respuestas alérgicas; y reacciones cruzadas de cefalosporinas con ampicilina [B]. Estos puntos se desarrollan centrándose principalmente en las reacciones IgE inmediatas, ya que son las más peligrosas pues están implicadas en las reacciones cruzadas entre ellos.

2) Normas legales. Buenas Prácticas de Manufactura en países industrializados como: España, EU, Canadá y URSS entre otros [C].

Estas bases se explican a continuación y están apoyadas en la bibliografía que se especifica al final. En la exposición, el término penicilina se usará en sentido amplio, genérico, para significar antibióticos beta - lactámicos que contienen un anillo beta - lactama y un anillo tiazolidina.

A. REACCIONES ALÉRGICAS A LOS ANTIBIÓTICOS BETA LACTÁMICOS

La penicilina es uno de los antibióticos menos tóxicos, conocidos hasta la fecha porque actúa en la pared celular de los organismos procariontes sin afectar virtualmente la célula eucariótica [12], esto hace que el ser humano tolere dosis de menos de 80 g/ diarios sin efectos adversos, sin embargo los

derivados de penicilina muestran un alto nivel de inmunogenicidad en humanos.

De acuerdo a informes que señalan la existencia de aproximadamente 8% de efectos adversos o reacciones alérgicas [13,14] en tratamientos con fármacos de penicilina, definiremos que una reacción alérgica es inducida por antígenos completos los cuales son moléculas de alto peso molecular y de tamaño suficiente como para atraer una respuesta inmune, esto es, provocar la producción de anticuerpos (Ig).

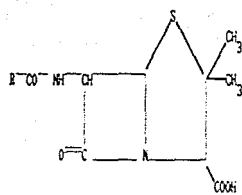
Por otro lado tenemos los haptenos, estos son compuestos pequeños de bajo peso molecular y también estimulan el sistema inmune en el individuo, pero tienen que unirse a un transportador o acarreador molecular, que usualmente es una proteína inmunogénica. La mayoría de los antibióticos incluyendo los beta lactámicos caen dentro de la categoría de haptenos [D].

Antígenos de penicilina. Los diferentes metabolitos de penicilina in vivo se consideran fuentes de antígenos primarios debido a que son capaces de unirse a proteínas autólogas, tisulares, polipéptidos y membrana celular formando un antígeno completo, con subsecuente estimulación de una respuesta inmune, como en las reacciones hematológicas donde se unen covalentemente con proteínas in vivo orientándose en la superficie celular.

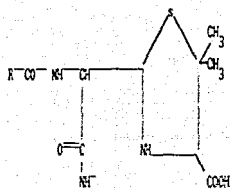
Aunque el fármaco patrón o sus metabolitos son estructuralmente similares, los anticuerpos responsables se pueden limitar a un metabolito específico, de esta manera tenemos que la mayoría de las uniones a proteínas tisulares (~95%) son en la forma peniciloil (PO) (fig 1) [2,5], por lo que, se le denomina determinante mayor responsable del máximo número de alergias a penicilinas. Un número de derivados de penicilina como el ácido peniciloico e incluso la misma penicilina nativa, se unen a proteínas tisulares (~5% del total), estos metabolitos tienen menor valor determinante [4,5], y son responsables de un pequeño número de reacciones alérgicas.

Las proteínas residuales contaminantes aisladas del ácido 6 - aminopenicilámico, presentes en todas las penicilinas, son responsables parcialmente de las reacciones de sensibilidad, de aquí que, pacientes sensibilizados puedan reaccionar también a las cefalosporinas [1]. En México se ha informado que 8.1% de individuos alérgicos a la penicilina han presentado choques anafilácticos mortales con alguna manifestación alérgica al administrar cefalosporina.

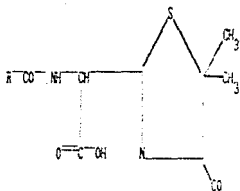
En términos generales el riesgo de presentar un cuadro de hipersensibilidad inmediato es de 2-7 veces si se recibe una cefalosporina habiendo el antecedente de alergia a penicilina [1].



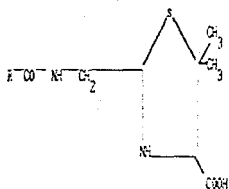
PENICILINA (PCN)



PENICILOIL (PO)



PENICILATO (PC)



PENILOATO (PI)

FIGURA 1. Estructura de determinantes importantes de penicilina

Anticuerpos de penicilina. El anticuerpo - IgE representa la memoria determinante para reacciones en la piel de tipo inmediato, bien puede ser la base de la mayoría de reacciones alérgicas tipo I. Levine y sus colaboradores, al estudiar pacientes sensibles con reacciones inmediatas en la piel [6], identificaron anticuerpos IgE para el determinante mayor peniciloil (PO) y tres determinantes menores: penicilina (PCN), peniciloato (PC), y penilato (PI), todos productos de penicilina (fig. 1).

El IgG se considera como el anticuerpo determinante para el desarrollo de anemia hemolítica inducida por penicilina. La prueba antiglobulina de Coombs es frecuentemente positiva con suero anti - IgG. La presencia de IgM asociada con penicilina puede ser detectada previamente en pruebas de hemaglutinación y usualmente no tienen gran significado clínico.

Se ha dado a conocer que del 70% al 90% de las personas expuestas a penicilina tienen un bajo, pero detectable, nivel de anticuerpos IgM primarios, contra la estructura peniciloil (PO) (fig 1) [6]. Aproximadamente en el 10 % de los recién nacidos se presentan anticuerpos IgM similares [16], los cuales se sintetizan en el útero, en contraste, IgG no cruza la placenta [17]. En estos términos, no es una sorpresa encontrar pacientes que en la primera exposición a fármacos presentan una reacción alérgica. Por consiguiente, es posible asumir que todas las personas están en un riesgo potencial puesto que todo mundo puede producir una respuesta inmune a penicilina.

Reportes mundiales sugieren que en individuos con atopía, (predisposición hereditaria a rinitis alérgica, asma, o dermatitis atópica) aumenta el riesgo de reacciones a penicilina [18,19]. En consecuencia, cuando a un paciente hipersensible se le administra penicilina, puede haber choque anafiláctico con colapso y algunas veces muerte en espacio de minutos, puede haber también una reacción de sensibilidad generalizada de 1 a 3 semanas con urticaria, fiebre, eosinofilia, dolor en articulaciones, edema angioneurótico, eritema multiforme y dermatitis exfoliativa, o bien desarrollarse una reacción de urticaria acelerada en unas horas.

1 SENSIBILIZACION A ANTIBIOTICOS BETA LACTAMICOS

Una reacción alérgica se hace evidente después de haber sufrido una primera exposición (Sensibilización) a la sustancia que estimula el sistema inmune (alergeno). Por lo que la penicilina al encontrarse ubicuamente en el ambiente, tal vez como resultado de la contaminación industrial, agrícola, y médica [14, 15], puede funcionar como alergeno. Por ejemplo la aplicación tópica, inhalación y exposición a penicilinas o bien la ingestión de comida tal como carne y leche que contenga residuos de penicilina es una de las mayores causas de Sensibilización.

Las macromoléculas de antibióticos lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) como se presentan en el mercado, raramente juegan un papel en la sensibilización, tal vez, la estructura peniciloil (PO) o contaminantes como polímeros de penicilinas de alto peso molecular, lo sean unidos a proteínas del proceso de fermentación / producción [8]. La cantidad presente de estos compuestos en los materiales hoy en día es pequeña comparada con las preparaciones farmacéuticas en el pasado. Sin embargo Ahlstedt y Kristofferson [9 - 11] han evidenciado que pequeñas cantidades de estos materiales pueden aumentar la inmunogenicidad a penicilina.

Es cuestionable que el remover completamente todas las proteínas unidas a contaminantes de penicilina elimine el problema del hapteno, ya que, los metabolitos penicilín reactivos pueden unirse no solamente con proteínas séricas, sino también a contaminantes macromoleculares y carbohidratos en la misma preparación, y así, volverse haptenos de un antígeno completo. La activación de una alergia a penicilinas en personas sensibles, frecuentemente requiere solo mínimas cantidades del orden de varias unidades o menos, por lo que se deben considerar todas las formas posibles de exposición como:

- a) dosificación (parenteral, oral o epidérmica)
- b) agujas e infusiones contaminadas con penicilina, donde la esterilización es insuficiente para remover completamente a la penicilina o sus metabolitos.
- c) Penicilina usada por dentistas en empaste de canales.
- d) Prueba epidérmica.
- e) Inhalación.
- f) Ingestión de alimentos con residuos de penicilina.
- g) En aceite o soluciones de aplicación en la piel.

Esto es también válido para otros antibióticos de aplicación general.

2 CLASIFICACION DE ALERGIAS A ANTIBIOTICOS BETA LACTAMICOS

La Clasificación de las reacciones a la penicilina se hacen por los mecanismos inmunológicos porque sus principios para estas reacciones, dan un fundamento razonable para el diagnóstico, de acuerdo con Andre Saxon [B]. Los diferentes tipos de reacciones a fármacos y los mecanismos inmunes asociados se dan en la tabla siguiente.

Tabla 1. Clasificación de reacciones a la penicilina

tipo de reacción y mecanismo inmune	síndrome clínico
I Anticuerpos IgE	Anafilaxis
	Edema larigeo
	Urticaria
II Anticuerpos citotóxicos	Anemia hemolítica
III Complejo antígeno-anticuerpo	Suero enfermo
IV Hipersensibilidad superficial	Dermatitis por contacto
Idiopáticas	Erupción maculopapular
	Nefritis
	Urticaria
	fiebre
	eosinofilia

Tomada de la bibliografía B

Reacciones tipo I: Resultan de la presencia de anticuerpos IgE preformados para determinantes antigénicos de penicilina (PCN). La producción de anticuerpos IgE resulta de una estimulación antigénica por el fármaco o por una reacción cruzada de estos compuestos. La primera exposición puede ser desconocida completamente y sin acontecimientos notables, el IgE responsable persiste por años, sin embargo, tiende a disminuir a través del tiempo [14,22]. Las IgE unidas a células cebadas tisulares reaccionan con la reintroducción del antígeno (determinante penicilín), desencadenando la liberación del factor quimiotáctico de los eosinófilos, histamina, activador a la bradicidina, la sustancia de liberación lenta de anafilaxis y otras, dando como resultado el cuadro clínico de

anafilaxis, atopia o urticaria. Aproximadamente 0.02% de tratamientos con penicilina se asocian con una seria respuesta inmediata [23-27].

Reacciones tipo II: La anemia hemolítica asociada con altas dosis de penicilina resulta de la producción de altos títulos de anticuerpos IgG para el determinante PO [28]. Durante el tratamiento, el fármaco se absorbe pasivamente en la membrana de las células rojas de la sangre enfocándose anticuerpos a este sitio (Reacciones tipo II). Estos IgG después activan el complemento para acelerar la limpieza de la célula roja cubierta en el sistema retículo endotelial. Así, estas reacciones no requieren anticuerpos IgE antipenicilina.

Reacciones tipo III: Actualmente una de las primeras causas del síndrome de suero enfermo (reacción tipo III) es una reacción alérgica a la penicilina. La formación del complejo inmune entre el anticuerpo IgG o IgM, los antígenos solubles de penicilina (probablemente PO) y el complemento, genera factores quimiotácticos para los neutrofilos, con inflamación local y destrucción del tejido.

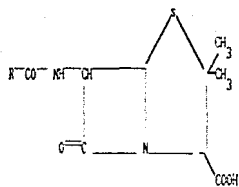
Reacciones tipo IV: Los linfocitos T sensibilizados reaccionan directamente al contacto con la penicilina, produciendo inflamación a través de la acción de las linfocinas, requiriendo linfocitos derivados del timo para reaccionar con los fármacos que se unen a proteínas tisulares. Esta no involucra la inmunidad humoral. El uso tópico de penicilinas se puede abandonar para eliminar la dermatitis por contacto, el diagnóstico se confirma por apreciación de hipersensibilidad retardada con pruebas de parche.

Reacciones idiopáticas: Una categoría de reacciones adversas a la penicilina son idiopáticas, ya que se han reportado varias respuestas inmunes anormales [31], además de algunos mecanismos inmunes inespecíficos. La mayoría de las reacciones alérgicas a antibióticos beta lactamas son una erupción maculo papular y fiebre. Esta reacción ocurre en 1% - 4% de tratamientos.

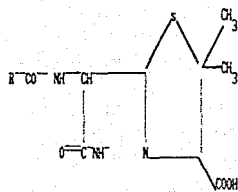
3 REACCION ALERGICA CRUZADA DE CEFALOSPORINAS CON AMPICILINA.

Las cefalosporinas son antibióticos beta lactámicos que difieren en la estructura de las penicilinas por la sustitución de un anillo dihidrotiazina por el anillo de tiazolidina de penicilinas (fig. 2). En una serie de mil pacientes, la incidencia de supuestas reacciones adversas o alergia fue de 1% - 3% [32].

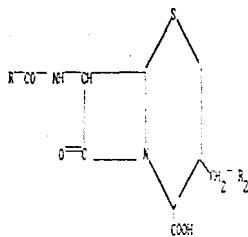
Las reacciones inmunes a cefalosporinas son muy bajas en comparación con las de penicilina y son del tipo IgE inmediatas, en ellas hay



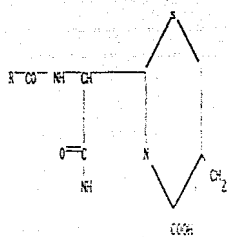
PENICILINA



PENICILOIL



CEFALOSPORINA



CEFALOSOROIL

Figura 2. Estructuras de núcleos de penicilina, cefalosporina y sus derivados, penicilloil y cefalosoroil.

anticuerpos mediadores y daño citotóxico (Tipo II), desencadenan anemia hemolítica, esta implicación es muy rara; en las pruebas de Coombs positivas [32] hay, relativamente, alta incidencia; síntomas semejantes a los del suero enfermo (Tipo III) o dermatitis por contacto (Tipo IV). La mayoría de reacciones hipersensibles potenciales a cefalosporinas se presentan en la piel con erupciones maculo papulares, fiebre eosinofilia.

A mediados de 1960 se reportaron algunos casos de pacientes con reacción inmediata después de ingerir una dosis inicial de cefalotin [33, 34]. Estudios subsiguientes en animales *in vitro* e *in vivo* mostraron paralelamente aumento en concentraciones de anticuerpos inducidos a antígenos de cefalosporina y PO. Los datos demuestran la reacción cruzada inducida entre anticuerpos no IgE a determinantes de penicilinas y cefalosporinas. Estudios posteriores sugieren que la respuesta inmune a cefalosporinas depende más de la cadena sustituyente que en el caso de las penicilinas. Siendo así, las cefalosporinas que presentan una cadena similar a las de benzil penicilinas son más fáciles de una reacción cruzada con penicilinas.

A los pacientes que se les administra cefalosporinas aumentan la concentración de anticuerpos de hemaglutinación que reaccionan con penicilina y a la inversa, pacientes dosificados con penicilinas aumenta la concentración de anticuerpos a cefalosporinas [35]. Estos resultados con pacientes concuerda con la reacción cruzada de anticuerpos no IgE a PO y algunos determinantes de cefalotin encontrados en animales [36 - 37]. Sin embargo, los anticuerpos no IgE parecen tener poca importancia clínica [38].

B. CONTAMINACION DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS

El problema ubicuo de contaminación de productos es conocido por cualquier persona involucrada en la manufactura control o distribución de fármacos. En efecto, el tipo de contaminantes que pone en peligro la salud de los seres humanos, las fuentes de contaminación y los métodos para la detección y prevención de ésta, es variada.

Un indicador de la importancia de este problema es el hecho de que la Federal Food Drug and Cosmetic Act of The United States [39] surge para poner todavía más énfasis en el aspecto de que no se debe incluir en un fármaco o su empaque cualquier tipo de contaminante. El punto se refuerza cuando se examina el hecho que el Official Compendial Standards [40, 42], proporciona un método de ensayo para identificar al fármaco, así como varias pruebas para la identificación de impurezas específicas esperadas e inesperadas.

1 NATURALEZA DE LOS CONTAMINANTES

En este apartado se han clasificado los contaminantes que aparecen en los productos farmacéuticos de acuerdo a su origen para ubicar el problema expuesto en el contexto de la contaminación farmacéutica.

Contaminación Mecánica. Está formada por materiales extraños que consiguen entrar en el medicamento [42, 43]. Estos se observan y se justifican fácilmente, ya que algunos de ellos son:

- tornillos de fierro en una sustancia farmacéutica para ingestión;
- astillas y fragmentos del equipo de proceso roto que se incorporan a los productos durante la manufactura;
- fragmentos de metales, astillas de madera, mechas de fibras textiles, cenizas, hongos, cabello, vidrio, goma elástica, fibra de plantas, hilaza, almidón, talco o asbestos;
- piezas de vidrio, plástico o metal que proviene de los contenedores de empaque.

En algunas fases de los procesos farmacéuticos de manufactura, se usan filtros de asbestos para remover material extraño incluso en la filtración final de parenterales, ya que aquellos tienen la propiedad de ser rápidos y minimizar el crecimiento bacteriano.

Contaminación química. La contaminación química ocurre por diferentes vías como:

Materiales obtenidos de fuentes naturales que contienen contaminantes importantes aún después de la purificación, por ejemplo: la hormona antidiurética vasopresor puede estar presente en la preparación de hormona pituitaria natural, cortoprim (hormona adrenocorticotrópica), y hormona del crecimiento humano. Esto explica la incidencia de retención de agua en algunos pacientes que reciben infusión intravenosa de cortoprim u hormona de crecimiento humano [44].

Algunas veces por equivocación a los productos se les adiciona ingredientes incorrectos, entre estos el más peligroso es un ingrediente fisiológicamente activo. La sustitución deliberada de ingredientes se hace por razones económicas, por lo general se sustituye un ingrediente natural por

uno sintético barato, e por razones de conveniencia basados en la gran disponibilidad de un distinto excipiente superior.

El problema de contaminación cruzada se describe como la presencia inesperada de un fármaco en otro, resultado generalmente de la propagación de partículas o polvo procedentes de la manufactura de otros productos. Esta debe estar bajo estricto control para evitar la contaminación cruzada [48, 47].

Históricamente la atención aumento al intentar controlar la contaminación cruzada de penicilina [48]. El asunto poco usual, muestra a ésta como alérgico, pues la recepción de dosis muy pequeñas de penicilinas como un contaminante en otro fármaco, puede volver sensible a un individuo, lo que crea una respuesta alérgica, e inclusive, un severo choque anafiláctico cuando se administra una dosis completa o menos [49]. La Hoc Advisory Committee on Penicillin Contamination [50, 51] de la FDA, fijó los límites de penicilina, en 1965, como sigue:

0.5 UI (0.3 Mg) para fármacos orales y

0.05 UI (.05 Mg) para fármacos parenterales en una sola dosis alta.

Presenta regulaciones nuevas que deben reducir la tolerancia a cero [52].

Algunos investigadores acordaron que debe prevenirse la contaminación con penicilina a otros productos, en este sentido es posible detectarla y cuantificarla en niveles muy bajos por la técnica específica de zona de inhibición/placa agar simple [57].

Contaminación microbiológica. Las inyecciones, los fluidos de infusión intravenosa y oftálmicos se requieren estériles ya que la presencia de un microorganismo vivo de cualquier tipo [58, 59] representa un riesgo para la salud por la patogenicidad y virulencia del organismo en relación al estado inmunológico de los pacientes y al número total de organismos presentes en la preparación.

Otros parámetros a considerarse, resultado de la presencia de microorganismos, incluyen la posibilidad de cambios en la actividad farmacológica, los efectos y fecha de caducidad.

2 PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN.

Este punto para la industria farmacéutica, es uno de los más importantes porque ayuda a evitar las pérdidas económicas que origina la producción de un lote contaminado. Es aquí, donde el presente proyecto de investigación se articula. Møller [60] enumera las siguientes áreas clave: premisas de personal, materia prima, proceso de trabajo, formulación y control. Molin [56] adiciona equipamiento y acondicionamiento. Estos factores servirán para prevenir la contaminación química y mecánica.

Construcción. Se refiere a la disposición y edificación general de la planta [60,61] como:

- a) Áreas adyacentes de producción y formulación,
- b) instalaciones de limpieza y almacenamiento,
- c) rutas de transporte del producto, separadas de las otras tanto como sea posible [56] además
- d) aislarse de áreas similares usadas para hacer otros productos.

En efecto, el modelo principal destina, para una planta farmacéutica, la subdivisión de áreas de producción en las llamadas unidades celulares donde es posible que el personal atraviese el departamento de producción sin pasar directamente en el área de trabajo. La admisión a varias áreas sólo es posible por las esclusas dispuestas para el cambio fácil de vestido.

La construcción de una planta bien diseñada incluye entradas para un sistema de succión que remueva el polvo o el polvo en puntos cruciales de un proceso de tableteo y recubrimiento. También es esencial que el material de la superficie interior de la planta de producción sea liso y fácil de limpiar. Además el uso adecuado de filtros, presión baja y recirculación de aire en toda la planta ayuda a prevenir la contaminación cruzada y expansión bacteriana [62].

El aire filtrado se consume uniformemente a través de toda el área de trabajo o habitación completa y se agita en el lado opuesto. Este sistema puede ser vertical u horizontal, el efecto de barrido resultante trae una mejoría considerable en la limpieza del aire, sin embargo, esta técnica de flujo laminar se debe examinar cuidadosamente para que sea efectiva en una situación particular [63].

Personal. Todo el personal que se involucra directamente en el proceso de producción, es de suma importancia para lograr la calidad de los productos [64]. Es inevitable que las personas se muevan dentro, fuera y cerca de las áreas de producción; ello ocasiona que sean contaminadores potenciales al caminar, hablar y respirar, ya que pueden diseminar polvos químicos o bacterias. Por tanto, el personal debe estar libre de enfermedades contagiosas y sujeto a los mismos requerimientos esenciales de salud que se exige a los trabajadores del área de alimentos. Los trabajadores farmacéuticos deben tener, así mismo, las instalaciones adecuadas y seguir rutinas prescritas para el cambio de ropa, zapatos y guantes. Es importante que mediante programas de educación continua, ese personal tenga el conocimiento y la formación apropiada.

Materia prima. Todas las materias utilizadas se deben obtener de fuentes confiables. Después de recibirlas en la planta y probarlas primeramente para su uso [48], deben guardar cuarentena en contenedores sellados, cuartos aislados y no abrirse excepto en la habitación de pesado o formulación.

Proceso de trabajo. Es necesario el estudio sistemático de nuevos procesos y procedimientos del trabajo para descubrir problemas. Algunos puntos críticos pueden ser [66 - 67] los tiempos inadecuados de secado o temperatura de granulación; agua de condensación en la superficie de ungientos o soluciones; y tapas que contengan agua residual después de limpiarlas [60].

Un método para descubrir algún problema del proceso consiste en sustituir una solución reguladora en el producto, atravesarlo continuamente [56] y muestrear en diferentes fases hasta localizar fuentes de contaminación.

La planeación de la bitácora para los procesos de producción se considera un punto clave [48]. Los fármacos, que de alguna manera son incompatibles, no se deben de manufacturar sucesivamente en el mismo equipo, ya que podría ocurrir contaminación cruzada.

Algunos pasos a considerar para la producción de tabletas la cual es inevitablemente polvorienta [47, 68] son:

a) Delimitar el área de peso de los ingredientes para evitar su esparcimiento en el ambiente;

b) mantener la presión negativa en las áreas de la vecindad de las máquinas tableteadoras;

c) evitar cucharas manuales en granulaciones elevando el cuñete y usar flujo continuo en la tolva;

- d) limpiar los contenedores que acumulen polvo, removiéndolos antes del área;
- e) limpiar a fondo cada pieza del equipo entre corridas de diferentes productos;
- f) contar con un área especial para desechar la ropa de los operadores.

Formulación. Primeramente una fórmula maestra es el documento donde se especifican los componentes (formulación) y el proceso de fabricación de un medicamento. Debe describir cuidadosamente todos los pasos: el equipo usado, el orden de adición de ingredientes, la duración del mezclado, precauciones, seguridad, etc. La fórmula maestra del lote es la clave para una producción libre de contaminación.

Control. El control de calidad debe funcionar permanentemente para mantener una producción satisfactoria [60].

El acondicionamiento, fabricación, ensayo de identidad y pruebas límite se deben ejecutar escrupulosamente en todo producto final para protegerse contra errores.

Una revisión periódica, útil en la limpieza microbiológica de un procedimiento es el método de sustitución de solución buffer en el producto, pero no se acepta como una prueba de rutina en el proceso porque es costoso, incompatible con las corridas normales de producción en términos de duración, y hay el riesgo de olvidar accidentalmente un medio bacteriológico, donde este, pueda volverse un sustrato de crecimiento microbiano.

Otra parte indispensable del sistema de control es el uso de inspectores entrenados en un sitio, quienes visualmente checan todas las partes de la producción, acondicionamiento y proceso etiquetado.

Equipo. El equipo se debe ensamblar de manera que se esterilice y se limpie fácilmente, especialmente entre cambios de productos para prevenir confusión de nuevos lotes con el residuo de los anteriores [56].

Máquinas como molinos, granuladores con boquillas y casquillo empaquetado usualmente son difíciles de limpiar. Por esta razón se debe desmantelar una extensión suficiente que permita la limpieza adecuada.

Acondicionamiento. Miller y Korczynski [73] bosquejaron varios aspectos del acondicionamiento de fármacos y cosméticos desde el punto de vista de una empresa de empaque no involucrada en el proceso de manufactura primario. La gran variedad de productos manipulados requiere que la empresa analice cuidadosamente los requerimientos de esterilidad y problemas de cada producto. Los productos se clasifican en grupos y subgrupos de acuerdo a la forma de dosificación, demanda de rótulos, uso determinado y estabilidad.

3 DETECCIÓN DE CONTAMINANTES.

La detección de fármacos contaminantes es un problema extenso, con frecuencia requiere gran ingenio e imaginación. Mucho depende de la cantidad de información específica disponible para el análisis.

Una vez que el analista conoce que tipo de contaminantes busca, se simplifica el trabajo del químico en la detección de contaminación y el procedimiento usado depende de la naturaleza y nivel de contaminación, del fármaco, el equipo, instrumentación y tiempo disponible.

La percepción del problema de contaminación está influenciado grandemente por el desarrollo de técnicas modernas sofisticadas e instrumentación [75]. Se pueden detectar niveles de contaminación en partes por billón o partes por millón con cromatografía de capa fina [76 - 79], cromatografía gas líquido [80 - 82] con detectores sensibles, espectrometría de masa [83 - 85], activación de neutrón [86 - 87], y pruebas microcristalinas [87 - 89].

Sin embargo es imposible describir aquí todos los métodos que se usan para detectar materiales traza. La información relacionada específicamente con el problema se revisará en el apartado Métodos Analíticos para la detección de antibióticos.

C. ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LA LEGISLACION VIGENTE A NIVEL INTERNACIONAL PARA PREVENIR LA CONTAMINACION CRUZADA EN MEDICAMENTOS

Para la comunidad internacional farmacéutica, el problema de la contaminación cruzada no ha pasado inadvertido, y por ello en todo el mundo, se ha ido tomando conciencia de los peligros que esto implica, sobre todo en aquellos fármacos cuyos efectos nocivos pueden desencadenarse

mediante dosis muy pequeñas. Hasta ahora, no existe consenso sobre las exigencias cualitativas y cuantitativas que deben establecerse entorno a éste problema. Si bien todas ellas buscan disminuir o evitar la presencia de fármacos contaminantes en los medicamentos puestos en el mercado, las normas y los métodos que se establecen son diferentes. A continuación se presenta la legislación vigente en diferentes países.

En 1975, la Organización Mundial de la Salud establece en el punto número ocho referente a operaciones de fabricación, lo siguiente:

"Todas las operaciones con medicamentos muy activos, especialmente antibióticos, en el curso de las cuales se desprenda polvo, se realizarán en locales completamente cerrados y provistos de sistemas adecuados de extracción de aire o mantenidos a la presión necesaria para evitar la contaminación cruzada. Además se tomarán las precauciones adecuadas para que el aire contaminado no entre de nuevo en circulación".

La FDA en 1978 publicó "Good Manufactory Production (GMP)", en las cuales define e implanta los límites de tolerancia para la contaminación por antibióticos:

"Subpartes C.- Edificios e instalaciones.

Sección 211.42 Características de diseño y construcción.

d) Las operaciones relacionadas con la fabricación, elaboración y empaque de penicilina, se realizarán en instalaciones separadas de aquellas usadas para otros productos farmacéuticos para el consumo humano.

Subparte I; controles de laboratorio.

Sección 211.76 Contaminación con penicilina.

Si existe una posibilidad razonable de que un producto farmacéutico que no contiene penicilina haya estado expuesto a intercontaminación con ella, el producto farmacéutico que la contiene será sometido a prueba para determinar la presencia de la misma. Tal producto no se pondrá en el mercado si se encuentran niveles detectables de penicilina cuando se someta a prueba conforme a los procedimientos establecidos en los Procedimientos para Detectar y Medir Contaminación con Penicilina en Fármacos".

Las Buenas Prácticas de Fabricación, emitidas por la Dirección General de Protección de la Salud, del Ministerio de Salud y Bienestar Social de Canadá, puntualiza en el capítulo de instalaciones lo siguiente:

"Las instalaciones donde se produce un lote total o parcial de medicamentos, deben ser diseñadas, construidas y mantenidas en forma que: e.- Evite la contaminación del producto y la adición de sustancias extrañas al medicamento".

En Holanda, las Buenas Prácticas de Manufactura (1984), dentro del capítulo número siete "Procedimientos de Control de Producción y Acondicionamiento". Inciso 7.4 Medidas para evitar contaminación cruzada, establece que:

"Durante las maniobras con materia prima seca, deberá presentarse atención especial a la prevención de la proliferación y de diseminación del polvo. Esto involucra particularmente a la elaboración de los productos con materias primas que causan hipersensibilidad o son activas en muy pequeñas dosis. En ese mismo inciso considera la ropa de protección para las tareas que se llevan a cabo con productos que contienen materias primas con riesgo especial de contaminación cruzada, de acuerdo con procedimientos específicos.

Las Normas de Correcta Fabricación y Control de Calidad de los Medicamentos, emitidas por el Ministerio de Sanidad y Consumo de España en 1985, apunta en el capítulo número cuatro "Locales" inciso 4.1.1 que:

"Merece especial atención y tratamiento los locales destinados a fabricar medicamentos estériles, ciertos antibióticos, hormonas y citostáticos. Es absolutamente necesario disponer de áreas separadas específicamente diseñadas para estos fines, así como de una documentación especial que indique tanto el tiempo como la forma de limpieza y esterilización".

En la URSS, All Union Research Institute Antibiotic, en 1989 introdujo normas higiénicas antes y durante la producción de antibióticos, la cual marca el nivel máximo permitido en el aire, las propiedades físico-químicas, características y efectos de las penicilinas en el hombre.

En México la Guía de Prácticas Adecuadas de Manufactura Farmacéutica, edición número 3 de 1989, avalada por la Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, indica en el capítulo V "Instalaciones" lo que aparece enseguida:

1.2 Diseño y Construcción

"h) El manejo, procesamiento y empaque de productos, tales como beta lactámicos, hormonales, veterinarios y todos aquellos que marque la Regulación Sanitaria vigente, deberán estar separados completamente de las áreas empleadas para otro tipo de productos.

Capítulo VIII. Control de Fabricación.

Inciso 5. Control de Contaminación.

5.2 Control de Contaminación Cruzada.

5.2.3 En la fabricación de los productos beta lactámicos, hormonales, veterinarios y todos los que marque la regulación sanitaria vigente, el personal que realice dichos procesos, no deberá tener acceso a las demás áreas de producción, portando la indumentaria que emplee en aquellas, además de cumplir con los requisitos mencionados en el capítulo V inciso 1.2 h.

En el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, en el capítulo II se instituye así:

"Artículo 32. Está prohibida la venta o suministro de los productos o materias primas que sean acuteradas, contaminados, o alterados durante cualquiera de las fases del proceso. La infracción de ésta disposición originará la disposición de medidas de seguridad por parte de la Secretaría, además de las sanciones administrativas que procedan.

Artículo 33. Se considera adulterado un producto cuando:

1. Su naturaleza o composición no corresponda a aquellas con que se etiquete, anuncie, expendi, suministre o cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización.

Artículo 34. Se considera contaminado el producto o materia prima que contenga microorganismos, formonas, bacteriostáticos, plaguicidas, radioisótopos, así como cualquier materia o sustancia no autorizada o en cantidades que rebasen los límites máximos permitidos que establezca la Secretaría u otra autoridad competente.

Artículo 35. Se considera alterado un producto o materia prima cuando por efecto de cualquier causa, haya sido objeto de modificaciones en su composición intrínseca que lo convierta en nocivo para la salud. De acuerdo a lo establecido en la Ley General de Salud, y en el Reglamento correspondiente, no debe haber medicamentos en el mercado, que se encuentren contaminados, adulterados o alterados".

Algunos países hacen énfasis en los beta lactámicos, esto es por el riesgo de choque anafiláctico aun en pequeñas cantidades. En México las medidas acordadas se consideran de dos maneras: una a nivel de

recomendaciones y otra a nivel legislativo. Con el fin de cumplir ésta última se diseñó el muestreo ambiental para detectar ampicilina y cefalexina en áreas de fabricación.

II ASPECTOS ANALITICOS E HISTORICOS DE ANTIBIOTICOS BETA LACTAMICOS

El término antibiótico se refiere a sustancias producidas en general por microorganismos, los cuales son antagonistas para el crecimiento de otros microbios. Las penicilinas y cefalosporinas son dos familias importantes de antibióticos beta lactámicos que se caracterizan por tener un grupo amida cíclico de cuatro miembros (lactama), y se producen por varias cepas de hongos *Penicillium*.

Haciendo una breve crónica de la historia de la penicilina, podemos decir que en estudios realizados por Fleming en 1929, descubrió accidentalmente la penicilina dándola a conocer el mismo año. A principios de 1939, Florey y Chain solicitaron un donativo de la División Nacional de Ciencias de la Fundación Rockefeller en Inglaterra para costear sus investigaciones, y en julio del mismo año junto con sus colaboradores, comenzaron sus primeros trabajos con penicilina, aislaron el material de forma heterogénea a partir de un cultivo de hongos *Penicillium notatum* y mostraron el efecto in vivo, el cual resultó muy poderoso contra varios organismos patógenos.

En 1940 Chain junto con otro colaborador, Abraham, descubre la presencia de penicilinas beta lactamasas, un enzima de *E. Coli* la cual degrada e inactiva a la penicilina. Esta fue la razón por la cual el desarrollo farmacológico se enfocó a la síntesis de antibióticos estables a las beta lactamasas, al aislamiento y caracterización de los núcleos básicos de los beta lactámicos; el ácido 6-Amino Penicilánico (6-APA) y el ácido 7-Amino Cefalosporánico (7-ACA).

El gobierno británico bajo la presión de la Segunda Guerra Mundial le era imposible aceptar las nuevas responsabilidades de ésta investigación, para hacer frente a ésta situación, Florey y Heatley acudieron a los EEUU en el verano de 1941 para intentar interesar a la industria farmacéutica norteamericana en la manufactura de éste importante medicamento logrando su apoyo. Durante los años siguientes, se trabajó intensamente para preparar la producción comercial y la síntesis de antibióticos. A pesar de esto, la primera síntesis química total de una penicilina, penicilina V, que confirmó la estructura y dió un rendimiento razonable se logró hasta 1957 [G].

Debido a que el 7-ACA proviene de la cefalosporina C y ambos productos son cuatro veces más caros que sus análogos 6-APA y penicilina G, la industria se enfocó a rutas químicas más baratas como Gist-Brocades que desarrolló una tecnología de 11 pasos para sintetizar 3-sustituidos del 7-ACA a precios competitivos. Similarmente Otsuka Chemical desarrolló un proceso de electrosíntesis de 5 pasos, que abre la posibilidad de síntesis de cefalosporinas a partir de penicilina.

A partir de la cefaloglicina, derivado cefalosporánico del 7-ACA, se preparó por vía química la cefalexina, producto de alta actividad antimicrobiana, la cual sirvió de base para buscar la preparación del núcleo

básico del ácido 7-Amino desacetoxo cefalosporánico. Cabe mencionar que se ha estimado que más de 50,000 beta lactámicos han sido sintetizados y evaluados para tener un poco más de 50 de estos compuestos de uso comercial en todo el mundo.

La introducción de nuevas penicilinas y cefalosporinas han incrementado el campo de los beta lactámicos (fig. 3).

A. ESTRUCTURAS BASICAS, REACTIVIDAD QUÍMICA, CLASIFICACION Y MECANISMOS DE ACCION

En este apartado se presentan las características físico-químicas, propiedades farmacológicas, y fisiológicas de la familia de antibióticos beta lactámicos, de ampicilina y cefalexina.

1. ESTRUCTURAS BASICAS

La configuración estructural de los núcleos básicos de los beta lactámicos son las siguientes:

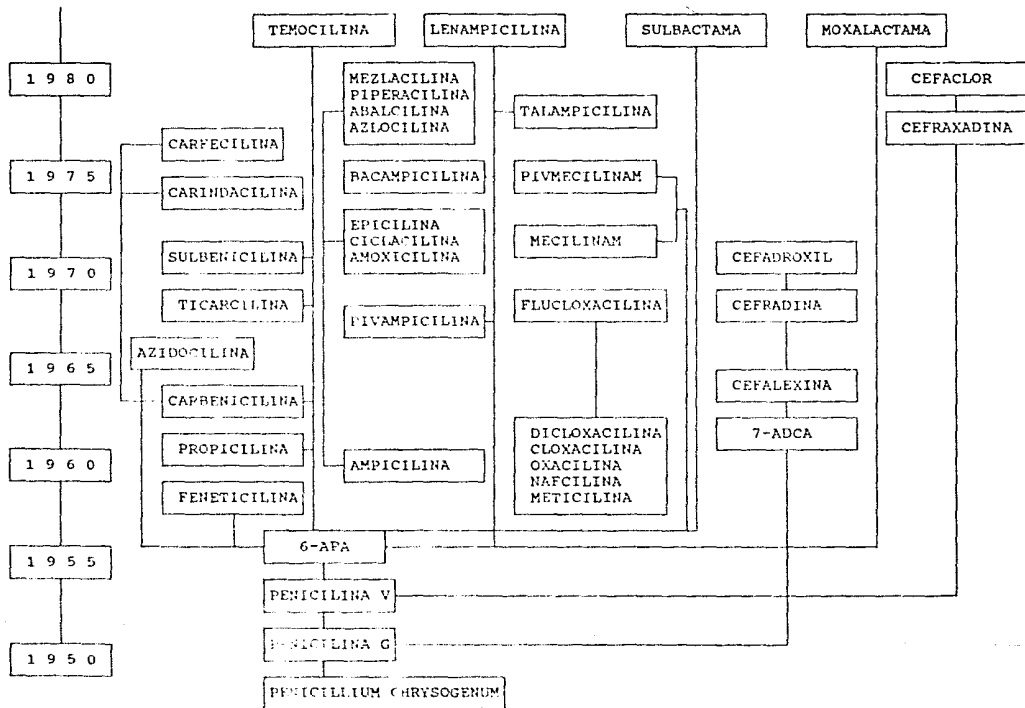
Las penicilinas poseen un anillo cíclico de cuatro miembros beta lactámicos unido a otro anillo de tiazolidina de cinco miembros (fig. 4).

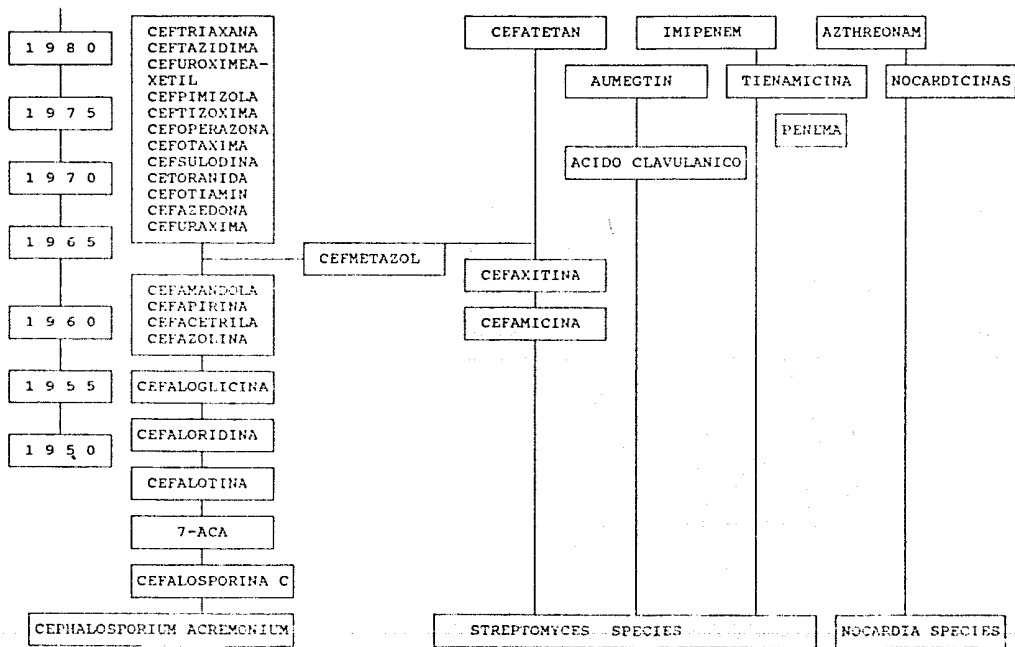
Las cefalosporinas poseen un anillo de dihidrotiazina de seis miembros unidos al anillo beta lactámico (FIG. 5).

2. REACTIVIDAD QUÍMICA DE ANTIBIÓTICOS BETA LACTAMICOS.

Las Beta-lactámas no son tan reactivas como las alfa-lactámas y se asemejan a las amidas, son atacadas por nucleófilos en el átomo carbonil, a diferencia de las amidas acíclicas normales o lactámas. El anillo adicional disminuye la forma resonante (6 B) con respecto a la forma resonante (6 A), esto hace al grupo carbonil de las beta lpetámas más semejante a un ester y se refleja en la absorción del grupo carbonil en el infrarrojo a 1730 cm^{-1} , comparado con la absorción de las amidas acíclicas a 1640 cm^{-1} . La preponderancia de la forma resonante (6 A) hace al grupo carbonil de la

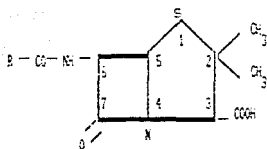
ARBOL GENEALOGICO DE LOS ANTIBIOTICOS BETA-LACTAMICOS NATURALES Y SINTETICOS





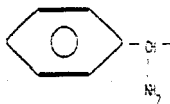
ESTRUCTURA GENERAL DE LAS PENICILINAS

FIG. 4 TOMADA DE LA BIBLIOGRAFIA 4.

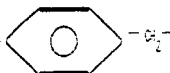


CADENA LATERAL (R)

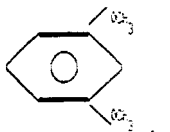
PENICILINA



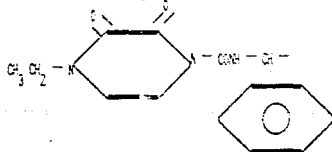
AMPICILINA



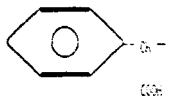
BENCILPENICILINA



METICILINA



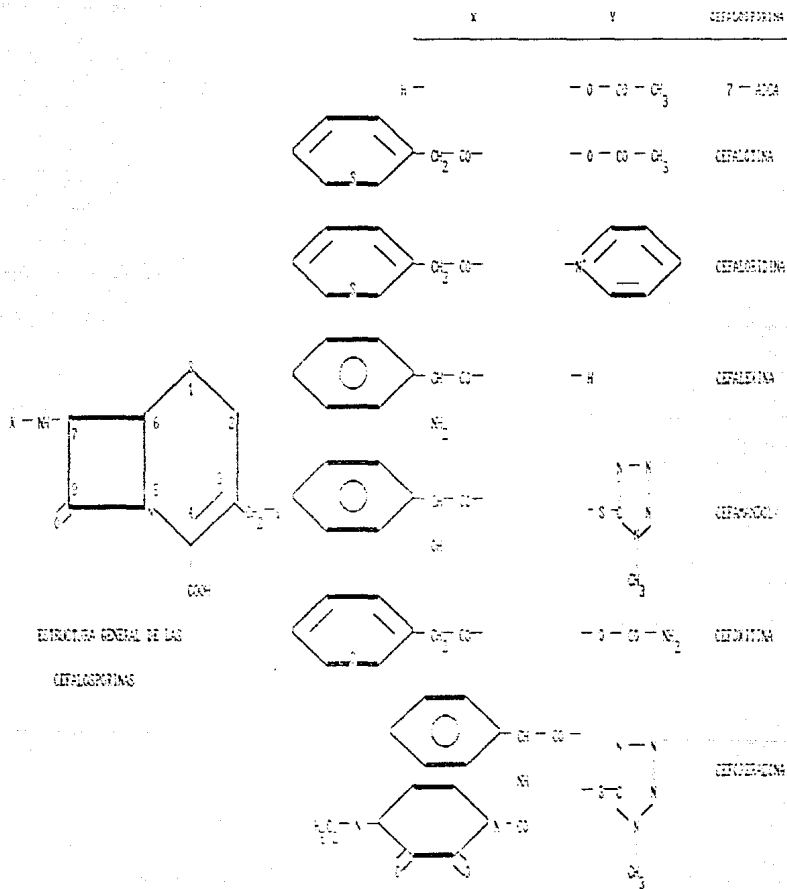
PIPERACILINA



CASEINICILINA

FIG 5

ESTRUCTURA DE ALGUNAS CEFALOSPORINAS COMUNES



beta lactáma más electrofílico que una amida acíclica, esto hace que la adición de un nucleófilo force a los anillos y se abra fácilmente. Las penicilinas y cefalosporinas son beta lactámas fusionadas a un segundo anillo heterocíclico, el cual tiene el efecto de mover la absorción amido-carbonil a 1770 cm^{-1} , lo que significa que este es un plano más reactivo. Esto es debido al hecho que el anillo fusionado no permite al nitrógeno del grupo amido rotar para llevar a cabo la alienación requerida en la forma resonante hibridizada Sp^2 (6B). Se considera que la alta reactividad de las beta lactamas es esencial para la actividad del antibiótico [1].

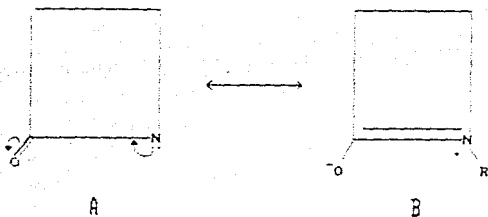


Figura 6. Formas resonantes del anillo beta-lactámico.

3. MECANISMO DE ACCION.

La eficacia de los antibióticos B-lactámicos se basa en dos posibilidades: 1) la inhibición de la síntesis de la pared celular y 2) la lisis de la misma.

En el primer caso se inhibe la síntesis de la pared celular interfiriendo con los peptidoglicanos, que son polímeros estructurales de la membrana superficial.

La transpeptidasa o proteínas receptoras de la penicilina (PBP), las cuales catalizan la formación de las uniones entre péptidos para construir la pared celular exterior, reaccionan uniéndose a los antibióticos B-lactámicos deteniendo la síntesis de la pared celular, resultando en la ruptura de la bacteria.

Para el segundo caso, se le atribuye a los B-lactámicos la activación de las autolisinas, enzimas que están involucradas en la división natural de la célula.

4. CLASIFICACION

Los antibióticos B-lactámicos se han clasificado en dos formas importantes:

- Por su estructura química Penicilinas
 - Cefalosporinas
 - Cefamicinas, etc.

- Por su espectro antimicrobiano. (Relacionado de forma razonable con su fecha de introducción).

Clasificación de las penicilinas según su espectro microbiano es la siguiente:

Primera generación: Espectro de actividad estrecho, limitado a bacterias Gram positivas, Cocos Gram Negativos ejemplo: Penicilina G, V, Metacilina, Oxacilina, Cloxacilina, Dicloxacilina

Segunda generación: También llamadas Amino Penicilinas. Son más eficaces contra enterococos, meningococos y algunos Bacillus Gram negativos aeróbicos. Aun así tienen menor actividad contra bacterias Gram positivas. Ejemplos: Amoxicilina, ampicilina, Ciclecilina, epicilina, Bacampicilina.

Tercera generación: Poseen un espectro más amplio incluyendo Pseudomona aeruginosa y Enterobacter. Son todavía menos activas contra bacterias Gram positivas ejemplos: Carbencilina, ticarcina, Propencilina.

Cuarta generación: O Penicilinas antiseudomónicas poseen actividad fuerte contra *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*. Ejemplos: Azlocilina, Mezlocilina, Piperacilina.

Debido a que los mecanismos de acción de los Cefalosporánicos son muy similares a los de los Penicilínicos, es de esperarse que los espectros antimicrobianos también lo sean.

Las Cefalosporinas se clasifican como:

Primera generación: Alta actividad contra Gram positivas y sólo moderadamente activa contra algunas Gram negativas. Ejemplos: Cefadroxil, Cefalexina, Cefazolina, Cefalotina, Cefaloridina, Cefradina.

Segunda generación: Mayor actividad contra Gram negativos y menor contra Gram positivos. Ejemplos: Cefaclor, Cefamandol, Cefoxitina, Cefuroxima.

Tercera generación: Muy poco activos contra Gram positivos y con un espectro muy amplio contra Gram negativos, principalmente anaerobios. Ejemplos: Cefoperazona, Cefotaxima, Cefsulodina, Ceftacídima, Ceftriaxona y Moxalactama.

B PERFIL ANALÍTICO

A continuación se presentan las propiedades químicas, físicas farmacológicas y fisiológicas de los fármacos en estudio, ya que son importantes para seleccionar los métodos de muestreo y de identificación.

1 AMPICILINA

a. Nombre D-(2-amino-fenilacetamida)-3,3 dimetil-7-oxo-4 tio-1-azobicyclo(3.2.0) heptano-2 carboxílico.

b. Fórmula condensada C₁₆ H₁₉ N₃ O₄ S

c. Fórmula desarrollada (figura 4).

d. Peso molecular. 349.42 gr/mol

e. Descripción. Polvo blanco cristalino, olor característico de penicilinas.

f. Punto de fusión

Ampicilina anhidra	199-202°C con descomposición.
Ampicilina monohidratada	202°C con descomposición.
Ampicilina trihidratada	214-215°C con descomposición.
Ampicilina sesquihidratada	199-202°C con descomposición.
Ampicilina sódica	205°C

g. Solubilidad trihidrato. Insoluble en etanol, acetona, éter, cloroformo, tetracloruro de carbono.

SOLVENTE mg de ampicilina trihidratada/ ml del solvente a 25°C

Dimetil sulfoxido	20
NaOH 0.1N	20
HCl 0.1N	20
Agua	6.66
Metanol	6.649
Ciclohexano	0.068
Eter de petróleo	0.038
Benceno	0.032

h. Constante de ionización, (pKa)

2.5 (COOH) 25°C

7.3 (NH₂) 25°C

i. Rotación óptica.

[α]_DTrihidrato + 249.5 a 252.7 (c=1, buffer pH 8.0)

[α]_DTrihidrato + 245.10 (c=1, buffer pH 8.0)

j. Espectro I.R. Puntos altos a:

1775, 1693, 1526, 1368, 1497, 1538 (tabletas de KBr)

k. Espectro U.V.

buffer de fosfatos pH 5.3 257 nm 262 nm 268 nm

I. Propiedades Farmacológicas

Usos terapéuticos. Antibiótico bactericida de amplio espectro.

Absorción. Fácilmente disponible en el cuerpo pero no se absorbe completamente después de la administración oral. Aproximadamente 30 % de una dosis oral se excreta en la orina en 6 horas como fármaco no transformado y aproximadamente 10 % como ácido penicilínico; después de una administración parenteral aproximadamente 75 % se excreta sin transformar en 6 horas. En bilis se alcanzan altas concentraciones de ampicilina.

Después de una dosis de 500 mg. se alcanza en 2 horas aproximadamente concentraciones pico en el plasma de 2.65 a 4 g / ml. (media 3.4).

Distribución en sangre plasma: Completamente en sangre razón 1.8. Unido a proteínas en plasma, aproximadamente 20 %.

Volumen de distribución. Aproximadamente 0.2 a 0.5 litro /kg.

Aclaramiento en plasma. Aproximadamente 3 a 4 ml / min / kg.

Vida media en plasma. Aproximadamente 1 a 2 horas.

2 CEFALEXINA

a. Nombre. Ácido desacetoxicefalosporico 7-(D-amino fenil acetamido).

b. Fórmula condensada $C_{16}H_{19}N_3O_5S$

c. Fórmula desarrollada (figura 5)

d. Peso molecular 365.4 gr/mol

e. Descripción Polvo blanco a color crema, cristalino, ligeramente higroscópico.

f. Solubilidad

Solvente	mg de cefalexina monohidratada/ml de solvente 25°C		
agua	13.5		
metanol	3.4		
N-octanol	0.03		
cloroformo	0.01		
éter	0.01		
g. Constante de ionización (pKa)			
	pKa		
solvente	carboxil	amino	
DMF 66%	5.2	7.3	
H ₂ O		7.1	

h. Rotación óptica $[\alpha]_D^{25} = -153$ (C = 1.0 en H₂O)

i. Espectro I.R. Puntos más altos a: 1775, 1693, 1526, 1308, 1497, 1583, tablas de KBr.

j. Espectro U.V. En solución acuosa 262 nm Acido clorhídrico 1N 258 nm

k. Propiedades farmacológicas

Usos terapéuticos. Antibiótico de amplio espectro.

Absorción: Las dosis orales de cefalexina se absorben rápidamente por los animales y el hombre, resultando concentraciones altas en el suero excretándose sin transformarse en la orina. La absorción oral rápida se demostró por el hecho que la actividad antibacteriana encontrada por varios investigadores fue de 15 $\mu\text{g/ml}$ y usualmente ocurre a 1 - 1.2 horas después de tomar el tratamiento. El compuesto es casi completamente absorbido en la parte alta del intestino delgado. El Antibiótico se excreta sin transformarse en orina casi con 100 % de recóbro.

Distribución: Cantidad de cefalexina unida a proteína en el suero varía con su concentración. En suero humano es de 9 % a concentraciones aproximadas de 1.0 $\mu\text{g/ml}$ y 41.65 a 0.2 $\mu\text{g/ml}$.

Vida media en suero: En una administración intravenosa la vida media es de 36 minutos, en una dosis oral es de 54 minutos [J,K].

C METODOS ANALITICOS PARA DETECTAR ANTIBIOTICOS

El siguiente apartado presenta brevemente el desarrollo de los métodos analíticos usados en la detección de antibióticos así como aquellos susceptibles de usarse para ampicilina y cefalexina.

1 ANTECEDENTES

En México y en el mundo se ha intentado controlar la contaminación por penicilina. Uno de los primeros países en hacerlo oficialmente fue EEUU al formar el Hoc Committee on Penicillin Contamination para evaluar el problema y hacer recomendaciones apropiadas, se desarrollaron métodos para la detección y cuantificación de penicilina residual como un contaminante en otros antibióticos y preparaciones farmacéuticas sin antibiótico. Para el control de contaminación cruzada por penicilina se publicaron en enero 29 de 1965 las Buenas Prácticas de Manufactura (GMP's). La Division of Antibiotic and Insulin Certification, ahora Center For Antibiotic Analysis (NCAA) publicó en octubre de 1965 métodos para complementar esta tarea.

Con la introducción de penicilina semi-sintética y cefalosporinas en el mercado, se cuestionó lo adecuado de los métodos para detectar residuos de nuevos fármacos. Herber et al. evaluaron la capacidad de los métodos usando la extracción de acetato de amilo para eritromicina y la de cloroformo para tetraciclina publicándse en noviembre de 1974, los resultados de recuperación para residuos de cinco beta-lactamas revelaron entre otras cosas, que los dos procedimientos de extracción son bastante limitados en su capacidad para detectar cefalotín residual (se detectan 5 ppm) e inadecuados para la detección de un picilina residual.

En consecuencia, se probó un proceso de extracción simple con cloroformo, dando buenos recobros de ampicilina y penicilina residual en materia prima de eritromicina y estolato de eritromicina, además se hizo clara la necesidad de nuevos procedimientos para detectar ampicilina residual. En respuesta a esto se desarrolló una técnica llamada bioautografía que puede detectar 2 ppm de ampicilina en tetraciclina [95], la cual al modificarse y aumentarse detecta ampicilina y penicilina residual en dimocielina y clortetraciclina. Este procedimiento se dio a conocer en julio de 1975 [96]. En México aun no existe un método oficial, sin embargo, los avances realizados en otros países han contribuido a la implementación de dichos métodos en los laboratorios que manufacturan beta antibióticos.

2. METODOS MICROBIOLÓGICOS

Los métodos microbiológicos son los más usados para detectar antibióticos residuales en medicamentos y alimentos sin antibiótico. Varios laboratorios en México toman como guía el método general descrito por la FDA para detectar y medir contaminación de penicilina en fármacos [57]. El procedimiento se divide en tres secciones: en la sección A se describen varios ensayos microbiológicos usando el método "inhibición de crecimiento bacteriano en placas de agar"; la sección B describe varios métodos de preparación de muestras para ensayo y la Sección C lista, en forma tabular, la combinación apropiada de ensayos y preparación de muestra para fármacos específicos. Estos métodos comprenden las aproximaciones básicas para la detección y cuantificación de penicilina como un "contaminante-cruzado".

El ensayo cilindro-placa es una prueba microbiológica que se usa para detectar y cuantificar antibióticos activos. Cuando una suspensión bacteriana mezclada homogéneamente en una capa de agar crece a una velocidad específica y un antibiótico en solución se adiciona a un cilindro colocado en la capa de agar con un organismo prueba sensible en su fase de crecimiento, el antibiótico deberá detenerse del cilindro al agar en una proporción específica inhibiendo el crecimiento del organismo. Esta inhibición se muestra por la aparición de un área circular clara (zona de inhibición) alrededor del cilindro en el cual el antibiótico se ha colocado, después de una incubación adecuada que permita el crecimiento del organismo. Comparando los diámetros (en mm) de las zonas de inhibición de la cantidad conocida de antibiótico con el diámetro de las zonas de inhibición de las muestras prueba, los antibióticos activos se cuantifican en la muestra de análisis.

La preparación de muestras para la mayoría de los productos farmacéuticos no-antimicrobianos (y algunas formas de antibióticos) es un proceso sencillo en el que soluciones acuosas o suspensiones de las muestras a examinar se preparan en cantidades mínimas de diluyente seguido de ajustes en el pH para neutralizar cuando sea necesario. Una gran variedad de formas farmacéuticas semejantes se pueden probar, solamente se deben hacer aproximaciones generales para llegar a un método de prueba apropiado para un producto farmacéutico específico. Si no hay problemas de interferencia por principios activos específicos en la inhibición, estos se pueden probar directamente sin modificación adicional a la muestra.

En el caso que los ingredientes de los productos farmacéuticos causen inhibición inespecífica de crecimiento y eleven o reduzcan la actividad de la penicilina contaminante, el problema analítico se puede eliminar preparando diluciones de la muestra naturalmente con una disminución en la sensibilidad.

Si las diluciones de la muestra a analizar no eliminan el problema, se hacen modificaciones adicionales en el ensayo para reducir, bloquear, o destruir la actividad de compuestos específicos. Hay ingredientes activos que aumentan o reducen la actividad de la contaminación residual, el error en la cuantificación del residuo se puede reducir significativamente preparando dosis estandar en un diluyente especial que es equivalente en contenido a la solución o suspensión prueba.

Para hacer diluyentes de este tipo se adiciona un producto comparable (o ingredientes individuales) libre de penicilina al diluyente acuoso normal, de modo que el diluyente especial contenga ingredientes libres de contaminantes en la misma proporción y concentración de la solución o suspensión a examinar.

Si los problemas de inhibición inespecífica continúan, se pueden hacer modificaciones con ciertos métodos de extracción que separen selectivamente los contaminantes residuales de los otros ingredientes del producto farmacéutico.

Las recomendaciones analíticas en términos de simplicidad y tiempo analítico se resumen como sigue:

- (1) Si hay posibilidades usar un método analítico directo,
- (2) Preparar diluciones adicionales de muestras para eliminar al mínimo los problemas de interferencia,
- (3) Hacer modificaciones específicas del método de ensayo para eliminar significativamente problemas de interferencia,
- (4) Proceder con un método de extracción específico con recobros apropiados y muestras control.

El método de ensayo microbiológico básico empleado para la detección de penicilina residual es el procedimiento de cilindro-placa con Sarvina lítea ATCC 9341, descrito previamente por Burke [97] en 1947, este procedimiento se uso ampliamente en los laboratorios durante los 25 años anteriores para cuantificar penicilina en productos lácteos, tejido animal, fluidos biológicos y en comida de animales con medicamentos como la penicilina. Este método está descrito en Official Methods of Analysis de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) y el Code Of Federal Regulations (CFR) [98].

Para la detección de penicilina en formas farmacéuticas se emplea además una cepa resistente al fármaco que se va a evaluar, por ejemplo, en

el ensayo de medicamentos con eritromicina se usa *S. lútea* ATCC 15957 resistente a 1.5 mg/ml de eritromicina).

Otro ejemplo son las formas farmacéuticas de estreptomina y dihidroestreptomina con *S. lútea* ATCC 9341a resistente a 50 mg/ml de estreptomina, también para fármacos de anfotericina y nistatina se trabaja con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, como último ejemplo las formas de dosificación para novobiocin usan *Staph. aureus* ATCC 12692 resistente a 5 Mg/ ml de novobiocin.

Los métodos para detectar residuos de penicilina en varios fármacos y alimentos se publicaron por la Asociación Oficial de Química Analítica en la FDA (102-104).

Los métodos enzimáticos son una modificación del método cilindro-placa pues los métodos microbiológicos no dan un grado significativo de especificidad en el análisis de fármacos residuales.

En el método de cilindro placa se inactiva una solución prueba por una beta lactamasa para dar evidencia de una beta lactama residual, y distinguir la actividad antimicrobiana de este residuo de la actividad que se pueda producir por otros agentes activos que no sea penicilina ni cefalosporina. Esta inactivación beta lactamasa sirve solamente para caracterizar el residuo como un antibiótico beta lactama pero no es adecuado para dar una identificación positiva del agente activo residual.

La inactivación beta lactamasa de la solución a prueba puede producir los siguientes resultados:

- (1) Inactivación completa (prueba positiva): La pérdida de actividad de una alícuota tratada contra una no tratada de la solución muestra indica la presencia de un residuo beta lactama. Se puede hacer una determinación cuantitativa del residuo en términos de un estándar apropiado.
- (2) Inactivación incompleta (prueba presuntiva) : La reducción significativa en la actividad de la alícuota tratada contra una no tratada de la solución muestra indica que un residuo beta lactama esta presente pero otros agentes o ingredientes activos pueden causar interferencia. No es posible una cuantificación exacta de los residuos beta lactama bajo estas condiciones.
- (3) No inactivación (prueba falsa) : No hay reducción significativa en la actividad de la alícuota tratada contra otra no tratada de la solución muestra, esto indica que agentes o ingredientes interfieren enmascarando la presencia de un residuo beta lactama y se puede hacer un análisis cualitativo o cuantitativo de los residuos.

- (4) No actividad (prueba negativa): La ausencia de zonas de inhibición de alicortas tratadas y no tratadas de la solución muestra indica que no se han detectado residuos de beta lactama (sin limitaciones del método).

Método bioautográfico. En este sistema, la separación cromatográfica da una identificación de los contaminantes que no es posible tener con los métodos anteriores, además tiene un cierto grado de simplicidad y rapidez. Investigaciones llevadas a cabo por Herbs, en 1974, utilizando técnicas descritas originalmente por Biagi [49], las cuales fueron hechas en un sistema de capa fina fase reversa, ampliaron el método bioautográfico para detectar e identificar penicilina G residual y ampicilina en 7 miembros de la familia de tetraciclina y en penicilamina [101]. El procedimiento exhibe un límite de detección en el rango de 0.5 - 1.0 ppm de penicilina o ampicilina en las tetraciclina y penicilamina. Se puede usar como suplemento de procedimientos en pruebas simples para dar datos suficientes en una identificación positiva de contaminantes farmacéuticos residuales.

Por otro lado Millipore publicó en 1973 [92-93] metodología especializada para la determinación de polvos diseminados de antibióticos. El procedimiento general involucra el paso de un volumen conocido de aire a través de un filtro de 0.22 μm de poro. Todo el residuo se disuelve en un buffer, y las porciones se incuban en placas de agar conteniendo una suspensión de microorganismos prueba. El diámetro de las zonas de crecimiento inhibido se miden y comparan en milímetros con aquellos obtenidos con el mismo antibiótico de concentración conocida o curva estándar. La sensibilidad del procedimiento es 0.001 unidades internacionales de penicilina y 0.004 Mg de clortetraciclina.

Una adaptación de este método fue hecha por Garth et. al. [94] con el propósito de hacer un estudio del medio ambiente de una construcción de seis-pisos que ocupan los laboratorios del National Center for Antibiotic and Insulin Analysis. Para las pruebas cualitativas y cuantitativas de penicilina y tetraciclina en muestras de aire de varios lugares del edificio se hicieron pruebas iniciales usando placas de agar, y el resultado se usó como una guía para el muestreo de aire en los puntos de fácil contaminación en las oficinas.

El resultado [84] de las pruebas indicó que la incidencia de contaminación por polvo de antibióticos no fue significativa en las habitaciones del laboratorio donde se probaron. La excepción de estos hallazgos fue un área de limpieza general donde se procesó jabón en polvo, antisépticos y cristalería contaminada con antibióticos. Los investigadores concluyeron que las personas que trabajan en el edificio de análisis de antibióticos y no están en contacto directo con estos, no se ven afectadas, mientras que los analistas de antibióticos sufren una mínima exposición. Si bien, estrictamente hablando, este hecho no concierne a la contaminación farmacéutica, se puede hacer una aproximación general análogamente en una planta farmacéutica.

Aunque los métodos descritos anteriormente son sensibles, su tiempo de análisis, el material y las condiciones para muestrear y procesar la muestra los hace poco prácticos y por lo tanto inadecuados para monitorear constantemente las áreas de producción durante la fabricación de medicamentos con ampicilina y cefalexina, siendo esta la razón por la que se buscaron otras opciones con los métodos químicos.

3 METODOS QUIMICOS PARA DETECTAR ANTIBIOTICOS

En seguida se mencionan las bases de algunos métodos analíticos susceptibles de usarse para detectar, cuantificar e identificar ampicilina y cefalexina.

El método volumétrico cuantifica una sustancia a partir de la concentración conocida y la cantidad medida de la solución reactiva, que se añade a la solución de la muestra hasta que la sustancia analizada se haya consumido en una reacción definida con dicho reactivo. El reactivo se llama titulante y la solución: solución titulante o valorada. La concentración se calcula a partir de la cantidad de titulante que se disuelve y se diluye en un volumen exactamente medido o bien se establece por medio de una determinación llamada valoración.

La titulación iodométrica se ha usado para la determinación de penicilinas. El método se basa en el hecho que solamente después de una hidrólisis alcalina o con penicilinasas las penicilinas consumen yodo. La diferencia en el consumo de yodo antes y después de la hidrólisis es proporcional a la cantidad de antibiótico. Para la cefalexina el método es comparable al método microbiológico de cilindro placa en exactitud, y es mucho más rápido. Probablemente, intermediarios usados en la síntesis respondan a la prueba.

Los métodos ópticos son métodos analíticos basados en la luz y su interacción con la materia. En este caso los términos "luz" y "óptico" no están restringidos a la radiación visible, sino que se aplica en un sentido más amplio, que incluye todo tipo de energía electromagnética radiante. Se pueden clasificar en aquellos que se basan en la absorción de la luz (absortimetría, incluyendo colorimetría, fotometría y fotometría de absorción a la llama) y en los que tienen como fundamento la emisión de la luz (espectroscopia y fotometría de emisión a la llama).

Colorimetría. Se usa para detectar metales de transición, en la región visible de la luz del espectro, como sales altamente coloridas con ciertos reactivos, además de iones inorgánicos como son: sulfitos, nitritos, fluoruros y metales iónicos. Los compuestos orgánicos que también producen un color cuando se adiciona un reactivo elegido cuidadosamente, se pueden

cuantificar por esta técnica un ejemplo es el quelato colorido formado por ion férrico y ácido hidroxámico de bencilpenicilina para la determinación colorimétrica de cefalexina, la hidroxilamina abre el anillo beta lactama (pH 7) para formar ácido hidroxámico el cual forma un complejo colorido con ion férrico. También reaccionan productos de degradación o intermediarios del anillo beta lactámico.

La emisión de radiación es el fundamento de varios métodos para determinar la concentración de contaminantes, uno de los cuales es el siguiente:

Fluorometría. se basa en la luminiscencia, que es la reemisión de luz previamente absorbida, en especial la fotoluminiscencia molecular, en la que los fotones de radiación electromagnética excitan a las moléculas, puesto que, las moléculas que han absorbido luz están en estados electrónicos más altos, estas deben perder su exceso de energía para regresar al estado normal. Si la molécula excitada regresa al estado normal emitiendo luz, exhibe fotoluminiscencia. El tiempo de degradación de la fluorescencia es del mismo orden de magnitud de la vida de un estado simplete excitado (10^{-9} a 10^{-7} s); la duración de la fosforescencia es de 10^{-2} a 10 s. La diferencia más sorprendente radica en las condiciones en las que se producen estos dos tipos de fotoluminiscencia. La fluorescencia suele aparecer a temperaturas moderadas en soluciones líquidas. La fosforescencia es común en medios sólidos, por lo general a temperaturas muy bajas.

La fluorescencia se presenta en moléculas aromáticas o que tengan varios dobles enlaces conjugados con un alto grado de estabilidad de resonancia. Ambas clases de sustancias tienen electrones pi deslocalizados que pueden pasar a estados singletes excitados de nivel bajo como en los sistemas aromáticos policíclicos, en los que el número de electrones pi disponibles es mayor que en el benceno. Un procedimiento usado en la determinación de ampicilina en fluidos biológicos es la formación de un producto fluorescente fuertemente amarillo a temperaturas elevadas; otro procedimiento con cromatografía de capa fina fluorescente se usa para determinar trazas de ampicilina, involucra la reacción de penicilina hidrolizada con isotiocianato fluorescente para formar la tiourea fluorescente correspondiente.

Los métodos electroquímicos abarcan una amplia variedad de técnicas basadas en los diversos fenómenos que tienen lugar dentro de una celda electroquímica. La cantidad o concentración de un componente se detecta en términos de: (1) el efecto de ese componente sobre un voltaje aplicado, (2) El efecto del paso de la corriente a través de la muestra al cambiar el estado químico del componente, o (3) el efecto del componente en el electrodo insertado en la muestra.

La polarografía esta basado en las curvas corriente-voltaje, que se originan en un microelectrodo cuando la etapa determinante de la velocidad en una reacción electroquímica es la difusión. Los análisis cuantitativos y

cualitativos de sustancias son posibles, siempre y cuando la sustancia en cuestión sea capaz de soportar una reducción catódica o una oxidación anódica. Las sustancias presentes pueden determinarse en concentraciones promedio de 10^{-2} a 0.01 M. La ampicilina se puede determinar en ppm por polarografía diferencial, sufriendo una reducción en un electrodo de mercurio, los picos obtenidos de esta polarografía se usan para el análisis cualitativo o cuantitativo de ampicilina.

La titulación amperométrica es una adaptación especial de la técnica polarográfica en la cual la corriente se mide en amperes. En este caso, el voltaje aplicado a través del electrodo indicador y del electrodo de referencia se mantiene constante, y la corriente pasando a través de la celda, se mide y se gráfica en contra del volumen del reactivo agregado.

La corriente se mide, en general, en una región de corriente de difusión de una curva de corriente-voltaje. En esta región, la corriente es independiente del potencial del electrodo indicador, debido al estado de extrema polarización de concentración en el electrodo. Como en la superficie del electrodo, la concentración del material que participa en la reacción que se está llevando en el se mantiene a un valor prácticamente igual a cero en la superficie de dicho electrodo, la corriente está limitada por el suministro de material a la superficie del electrodo por difusión. La velocidad de difusión, y por lo tanto, de la corriente, es proporcional a la concentración de la sustancia que se difunde en la solución global. En el caso de la ampicilina se hidroliza a penicilamina y el grupo SH de penicilamina se trata amperométricamente.

La cromatografía es un método de análisis en el cual un flujo de solvente o gas promueve la separación de sustancias por migración diferencial desde una zona inicial a lo largo de un medio poroso (adsorbente o absorbente).

Usando cromatografía de líquidos a alta presión (CLAP), Bracey [90] determinó trazas de ampicilina en cápsulas de Nitrofurantoina. El polvo de diez cápsulas se suspende en agua, se filtra a través de un embudo de vidrio, y se extrae con cloroformo. Una porción se inyecta en un cromatógrafo líquido-líquido con un detector UV. Se usa una columna de intercambio iónico fuerte y una fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5. Con este procedimiento, el límite de sensibilidad es de 0.1 mcg o más, pero es muy bajo para otros usos. Esto sugiere que el método, con preparación de muestras adecuadas, se puede aplicar a la determinación de ampicilina en otros fármacos. Niveles de 1 mcg/g de penicilina se pueden detectar convenientemente con métodos microbiológicos.

Un método químico rápido presenta desventajas donde haya otros antibióticos o el crecimiento de los microorganismos prueba se afecte por las mismas sustancias farmacéuticas. Se ha desarrollado un método de cromatografía de capa fina (CCF) donde dos gramos de muestra se agitan con 10 ml de agua y se ajusta a pH 6.5-7.0, después se centrifuga y la nata

superior se lava con cloroformo y se acidifica con ácido fosfórico (aproximadamente pH 2). Se extrae ácido peniciloico libre con cloruro de metileno, el cual se seca con sulfato de sodio anhidro.

Los extractos combinados se evaporan, y el residuo se extrae con acetato de isopropilo. Después de evaporar aproximadamente 0.05 ml (se espera un rendimiento del 90 %), se colocan 5 ml en placas para CCF. El método detecta cantidades desde 0.5 a 5 μg al usarse como una medida estandar con cualquiera de los cuatro sistemas de solventes para separación, que dan diferentes valores Rf. Los compuestos de penicilina se pueden visualizar o monitorear de diferentes formas, una alternativa es rociar reactivos no específicos a penicilina.

Otra alternativa de rociado es el proceso bioautográfico de Stahl [91]. El material penicilin-sospechoso se puede detectar si se pone en contacto con un agar inoculado con un microorganismo, la actividad biológica observada representa una comprobación de la presencia de penicilina. La mínima cantidad que se puede detectar es de 2.5 $\mu\text{g/g}$.

C METODOLOGIA DE MUESTREO AMBIENTAL

El propósito del muestreo ambiental es desarrollar criterios de calidad del medio ambiente. Se basa en coleccionar un volumen de aire (por ejemplo 1 m^3) y determinar cuantitativamente los contaminantes; estos se miden en microgramos, por lo tanto, su concentración en el aire muestreado se expresa en $\mu \times \text{m}^3$. Por ello es necesario contar con técnicas de colección de contaminantes y métodos de análisis.

Los factores que se deben de considerar en el muestreo son: la localización del equipo de muestreo y la longitud o duración del periodo de muestreo, los cuales se establecen de acuerdo al propósito de la prueba. Aquellos pueden determinar el rango de concentraciones de contaminación en un área dada o definir el periodo pico de contaminación en el área.

La localización de la estación de muestreo, la duración y la velocidad son determinantes en el tamaño de la muestra. Esta puede ser grande para dar exactitud estadística.

Un plan de muestreo debe incluir los siguientes componentes:

aire en movimiento,

medidor de flujo.

mecanismo de colección de muestra

detector de contaminantes para analizar la muestra.

El aire en movimiento crea un flujo que permite a los contaminantes ser capturados por un mecanismo de colección. Algunos ejemplos de aparatos que mueven el aire son bombas de vacío o aspiradoras, líquidos desplazados y matraces vacíos. Estos últimos combinan la función de mover aire y el mecanismo de colección.

Todo el plan de muestreo debe tener un medidor de flujo para determinar la cantidad de aire que está pasando a través de la serie durante un periodo de tiempo dado. Este se debe calibrar contra un parámetro exacto aceptado como una medida estándar.

Los mecanismos para la colección de la muestra varían considerablemente de acuerdo al tipo de partículas involucradas, sin embargo todos tienen el propósito de recopilar aire y detectar la cantidad de contaminantes en él, a continuación se describen algunos.

1 TECNICAS DE MUESTREO AMBIENTAL

Existen diferentes técnicas que se pueden usar para el muestreo ambiental, estas estarán determinadas por los contaminantes involucrados que se clasifican en partículas o gases. Las partículas varían en propiedades físicas tales como tamaño, densidad, forma y gravedad específica. Estas propiedades afectan el tiempo que las partículas residuales están en la atmósfera y por lo tanto van a determinar el método de muestreo.

Las partículas contaminantes están en suspensión cuando flotan libremente, por el contrario sedimentan si estas se separan del aire. Por ejemplo, el aceite, es una partícula pequeña y de baja densidad, queda en la atmósfera por periodos prolongados y se muestrea de acuerdo a los procedimientos para partículas en suspensión. A continuación se describen algunas de las técnicas más usadas.

La técnica gravimétrica se usa para coleccionar partículas que sedimentan, y determina la concentración de contaminación promedio en un área dada, no mide periodos de contaminación alta. Una pequeña muestra de aire se usa solamente para representar una gran cantidad de masa de aire. Algunos factores que influyen analíticamente son partículas adicionales de la atmósfera por precipitación, lluvia, formación o condensación de humedad

alrededor de una partícula, metales, y/o materiales redistribuidos por viento y corrientes de aire.

La técnica de filtración colecta partículas suspendidas que no sedimentan del aire, estas se remueven de una muestra por un aparato de succión (por ejemplo una bomba de aire) y se depositan en un filtro poroso. Es frecuente usar el muestreo de alto volumen, se debe prevenir la colección de partículas sedimentables a través de la bomba de flujo constante bajo el abrigo de una marquesina y de un filtro de fibra de vidrio donde se depositen las partículas. La unidad se calibra cuidadosamente contra una medida estándar para determinar la cantidad de flujo de aire en metro cubico colectado en un periodo de tiempo. El filtro se pesa antes y después de la colección para determinar el peso en microgramos. El resultado se reporta en microgramos por metro cubico.

La técnica inercial colecta partículas sedimentables y en suspensión. Una corriente de contaminantes se arrastra a un muestreador donde se colocan obstáculos en el camino que cambian la dirección de la corriente, pero continua desplazándose en la dirección inicial y choca con los obstáculos, si este tiene una sustancia adhesiva, las partículas se impactan en la superficie y al sumergirlo en un fluido, se quedan en el liquido. Al forzar una corriente rápida a través de un trayectoria circular, las partículas se arrastran fuera del centro y se separan por la fuerza centrifuga.

La técnica de precipitación se divide en precipitación térmica y electrostática. En la precipitación térmica se usa un alambre caliente para impulsar partículas radioactivas por convección térmica y bombardeo molecular fuera de la corriente a una superficie fría donde se colecta. Partículas de 0.01 a 10 μ se adhieren a la superficie. La precipitación electrostática usa una carga eléctrica para forzar partículas radioactivas a migrar fuera de la corriente a una superficie colectora. Esta técnica es efectiva para cuantificación química y microscópica para medir el tamaño de partículas radioactivas. Es mas efectiva para partículas de 0.01 u a 10 μ que pueden ser fijadas por una carga eléctrica, pero no se puede usar en presencia de gases explosivos.

Para recolección de contaminantes gaseosos solo se mencionaran las técnicas, ya que, las sustancias así colectadas no son de interés a esta investigación.

Las cuatro técnicas básicas para la colección de contaminantes gaseosos son absorción, adsorción, condensación, y muestreador de atrape.

2 PROCESO ANALITICO GENERAL PARA EL MUESTREO AMBIENTAL

El proceso analítico para interpretar datos de contaminantes gaseosos o partículas involucra:

- muestreo,
- separación,
- concentración,
- desarrollo de una propiedad medible,
- cuantificación de una característica apropiada,
- registro,
- cálculo e interpretación.

El muestreo incluye comúnmente concentración de la muestra este se discutió en los párrafos anteriores.

La separación elimina sustancias que interfieren con el desarrollo de una propiedad del contaminante que se pueda medir. El análisis de partículas solo requiere la separación por un filtro de alto volumen, cuando haya separación de partículas o pequeñas cantidades de compuestos orgánicos, inorgánicos y radiactivos, se observa microscópicamente y se comparan con fotografías particulares.

La concentración reduce el volumen de una sustancia dada. Se puede incorporar dentro del proceso de muestreo o separación

El desarrollar alguna propiedad distintiva, en algunas determinaciones, es necesario para poder medir el contaminante. Por ejemplo, en un proceso de muestreo de gases, se ponen en contacto con sustancias químicas específicas que producen reacciones de colores distintivos. Esta intensidad de color se mide fácilmente.

La medición de una propiedad característica es básica para la clasificación de algunos procedimientos. Los Resultados cuantitativos se pueden obtener solamente midiendo la propiedad adecuada o comparando esta intensidad con algún estándar de referencia.

Las formas de registro estandar se deben establecer para escribir los datos obtenidos manualmente como son cartas o registros digitales. Algunos sistemas de registro se teclan en computadoras que advierten el paso de aire contaminado por una alarma. Los datos computarizados permiten recuperar rápidamente todos los datos registrados. Sin embargo, es difícil la comparación de datos de aire contaminado debido a los diferentes sistemas de registro usado y las distintas unidades en que se reportan, ya que cada compañía utiliza su propio método para asegurar la correlación de datos en el futuro se ha recomendado expresarlo en unidades estandar. Actualmente se han aceptado microgramos por metro cubico ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Para el cálculo es necesario determinar el peso o volumen del aire muestreado y peso o volumen de los contaminantes dentro de la muestra, su concentración se expresa en términos específicos. Los resultados se expresan a veces como una media aritmética o como una media geométrica.

La interpretación es importante cuando los datos se pueden normalizar (ajustar valores por algún factor) para asegurar que la suma de valores no exceda el 100 %. Para la interpretación de grandes volúmenes de datos normalmente se proyectan en gráficas de probabilidad, curvas de distribución de frecuencia, gráficas, o tablas [N].

III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La institución de Normas Higiénicas en la producción de antibióticos señala la implementación de métodos de control ambiental en áreas de producción beta lactámica de una planta farmacéutica con el fin de evitar la contaminación cruzada. Para ello se debe integrar una técnica de muestreo ambiental y un proceso analítico a la muestra, además de considerar que los tiempos empleados en dicho control son determinantes en el costo de producción, ya que incrementan los costos en general, lo que implica pérdidas económicas para la empresa, pero estas pérdidas serían mayores si se produjeran lotes de medicamentos contaminados por ello se diseñó el muestreo ambiental para detectar ampicilina y cefalexina en áreas de producción con las siguientes exigencias:

1. El procedimiento total debe ser sencillo y rápido para que lo usen constantemente los inspectores de control de calidad, en el monitoreo de áreas de producción de formas farmacéuticas con ampicilina o cefalexina; o bien después de limpiar las máquinas y el área a donde se fabricó alguna forma farmacéutica con dichos antibióticos.

2. No debe interferir con el proceso de producción.

3. El muestreo y el análisis no debe ser costoso esto es:

a) los reactivos y el equipo no deben ser sofisticados;

b) los resultados se deben obtener inmediatamente para que no haya tiempos improductivos.

Para lograrlo se deben buscar y probar las diferentes posibilidades metodológicas y analíticas aplicables a las características físicoquímicas de los beta lactámicos.

OBJETIVOS

- Seleccionar e implementar técnicas colorimétricas para detectar ampicilina y cefalexina.
- Adaptar la técnica de muestreo ambiental (aire y superficie) en una planta farmacéutica.
- Integración del control ambiental de ampicilina y cefalexina en áreas de producción de una planta farmacéutica.

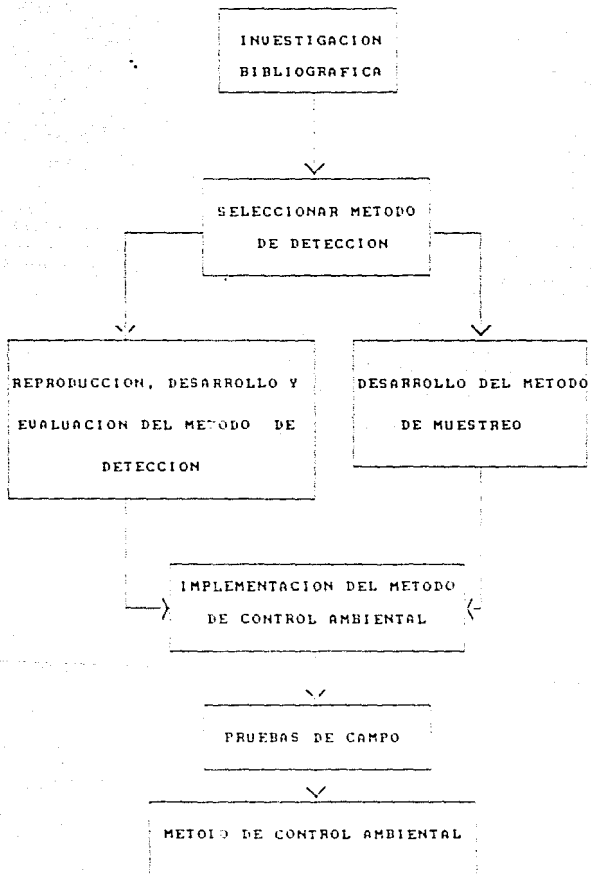
HIPOTESIS

:

La ampicilina y cefalexina son antibióticos beta lactámicos que causan efectos adversos de tipo inmunológico. Si un laboratorio de productos farmacéuticos cuenta con un método de muestreo y análisis para detectar estos antibiótico se disminuirá o evitará el riesgo de producir lotes con estos contaminantes.

IV DESARROLLO EXPERIMENTAL

DIAGRAMA DE FLUJO



A. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

1 Gradilla

20 Tubos de ensayo

pipeta volumétrica 1 ml. 2 ml. 5 ml.

pipeta graduada 1 ml. 2 ml. 5 ml.

vasos de precipitados 50 ml. 100 ml.

matraces aforados 10 ml. 25 ml. 50 ml.

Balanza analítica METTLER AE 100

Parrilla de calentamiento CORNING PC 333

Muestreador ambiental STAPLEX VM 03 (APENDICE I)

Muestreador de superficie (APENDICE II)

Plantilla cuadrada de
plástico de 25 X 25 cm.Filtro de esteres de
celulosa de 1.2 micras MILLIPORE

REACTIVOS

Sulfato cúprico	R.A.	Merck
Acido cromotrópico	R.A.	Merck
Nitrito de sodio	R.A.	Becker
Potasio de sodio tartrato	R.A.	Becker
Cloruro de Hidroxilamina	R.A.	Becker
Hidróxido de Sodio	R.A.	Merck
Acetato de sodio	R.A.	Merck
Sulfato Férrico Amónico	R.A.	Merck
Acido sulfúrico	R.A.	Becker
Etanol	R.A.	Becker
Acetona	R.A.	Becker

**B. SELECCION DE METODOS COLORIMETRICOS PARA
AMPICILINA Y CEFALEXINA**

Objetivo: Probar y seleccionar los métodos colorimétricos adecuados (sensibles y rápidos) para detectar ampicilina y cefalexina.

SOLUCIONES REACTIVO

DESCRIPCION	PREPARACION
Solución potasio - Tartrato	Mezclar volúmenes iguales de la Cúprico (FEHLING) Solución A y B
Solución A.	Disolver 34.6 g de sulfato cúprico en 500 ml de agua
Solución B.	Disolver 173 g de potasio de sodio tartrato y 50 gr de NaOH en 400 ml de agua, calent ar dejar que se enfríe y diluir a 500 ml.
Solución reactivo 1	Colocar en un matraz erlenmeyer 1 gr de nitrito de sodio y adicionar 5 ml de ácido sulfúrico. Agitar la mezcla en un baño de hielo dentro de una campana de extracción.

Procedimiento

Reacciones colorimétricas de identificación para ampicilina

I. Suspender 10 mg de ampicilina en 1 ml de agua y adicionar 2 ml de una mezcla de 2 ml de Solución potasio-tartrato cúprico y 6 ml de agua; inmediatamente se produce un color violeta-magenta.

II. Adiciona 2 o 3 gotas de la Solución reactivo 1 a la muestra y a un blanco. Si la muestra da color, la prueba se debe hacer rápido usando ácido sulfúrico en lugar del reactivo, en el mismo orden de adición para cerciorarse que el color observado no se debe a los reactivos. A veces es necesario llevar la prueba en un tubo y calentar en un baño de agua a 100 °C.

III. A 2 mg de ampicilina adicionar 2 mg de ácido cromotrópico sódico y 2 ml de ácido sulfúrico (96% w/w) y sumergir en un baño de aceite a 150°C. Agitar la Solución y examinar a los 2 minutos exhibe un color púrpura; entre los 3 y 4 minutos un color violeta y, finalmente rojo cereza.

IV. Tomar 2 ml de una Solución de ampicilina (10 mg /100 ml de agua) adicionar 1.25 ml de reactivo de hidroxilamina neutra (ver pag. 52) y dejar reaccionar 5 minutos; adicionar 1.25 ml de reactivo sulfato férrico amoniacal. Mezclar, se observa un color rojo (METODO I).

Reacciones colorimétricas de identificación para cefalexina

I. 20 mg de cefalexina se mezclan con 5 gotas de una Solución de ácido sulfúrico al 80% v/v que contenga ácido nítrico al 1 % v/v, se produce un color amarillo.

II. 20 mg de cefalexina se mezclan con 5 gotas de una Solución de ácido acético glacial al 1% y 2 gotas de una Solución de sulfato de cobre (II) y una gota de Hidróxido de sodio 2 M; se produce un color verde oliva.

III. A 2 ml de una Solución de cefalexina (10 mg/ 100 ml de agua) adicionar 0.5 ml de Solución Hidróxido de sodio al 13 % y 0.3 ml de acetona; calentar en un baño de agua durante 3 minutos; se produce un color rojo (METODO II).

Método colorimétrico para detectar ampicilina y cefalexina

I. Colocar 1 mg de ampicilina o cefalexina en un tubo de ensayo, humedecer con 0.05 ml de agua y adicionar 2 ml de ácido sulfúrico (96 % w/w). Agitar la mezcla y sumergir el tubo en un baño de agua por un minuto, examinar el color amarillo pálido. Repetir el procedimiento usando 2 mg de la sustancia a examinar y 2 ml de una mezcla de 2 ml de Solución de formaldeído y 100 ml de ácido sulfúrico (96 %) en lugar de ácido sulfúrico. Ampicilina produce un color amarillo obscuro y cefalexina amarillo claro.

RESULTADOS

TABLA 1. Observación visual de los métodos colorimétricos probados

REACCIONES		CONCENTRACIONES (PPM)		
		5	100	200
AMPI	I	-	-	+
CILI	II	-	-	+
NA	III	-	-	-
	IV	-	+	++
CEFA	I	-	-	-
LEXI	II	-	-	-
NA	III	-	++	++
AyC (A)	I	-	-	+
AyC (C)	I	-	-	+

- ++ Coloración intensa
 - Color perceptible visualmente
 - No hay color

Discusión de resultados

El primer parámetro a considerar en la selección de los métodos de detección de ampicilina y cefalexina fue determinado por el objetivo propuesto a lo largo de esta investigación, es decir, encontrar un método que permitiese detectar a tiempo una posible contaminación del aire ambiental y no una corrección en el producto terminado. Por ello, se descartaron métodos analíticos que, aunque sensibles tenían el inconveniente de consumir tiempo, requerir equipo costoso y de capacitación del personal.

De la misma manera fue necesario considerar en la elección del método la rapidez de su realización aún a costa de la sensibilidad, como es el caso del método para ampicilina, debido a que una vez establecido este análisis como un paso o una etapa más de la producción, el consumo de tiempo conllevaría tiempos muertos en la fabricación pues un método de muestreo lento y luego un método de análisis tardado detendría máquinas, personal, etc., aumentando por supuesto el costo de producción del medicamento.

Por lo demás, y esta fue una tercera exigencia, el método también debía cumplir con la posibilidad de una apreciación fácil y rápida por parte de los inspectores de control de calidad pues el tiempo de que disponen siempre es limitado.

Debido a todo lo anterior se decidió probar a los métodos basados en los fenómenos de la luz, en particular el desarrollo de color producto de la reacción de los antibióticos con alguna sustancia.

Las reacciones colorimétricas probadas fueron: para ampicilina la formación de un complejo con cobre (reacción I), con hierro (reacción IV), de una sal de diazotio (reacción II) y de un cromorfo con ácido cromotrópico (reacción III); para cefalexina la formación de un complejo con cobre (reacción II), y de cromorfos (reacción I y III). De las cuales las reacciones II, III para ampicilina y I, II para cefalexina respondieron únicamente a las muestras en estado sólido, al realizarse la reacción III con la muestra de ampicilina en solución se proyectó, por la temperatura a la que se sometió la muestra. Esto las hizo inadecuadas para manejarlas y adaptarlas a las técnicas de muestreo.

De las reacciones I, IV para ampicilina la diferencia visual entre el blanco y la muestra fue más clara en esta última (tabla 1), por lo que, de las diferentes reacciones colorimétricas probadas, las más sensibles y rápidas (sencillas) fueron para ampicilina la formación del complejo hierro-ácido penicilico rojo (tabla 1) y para cefalexina la presencia de color rojo al calentarla a 90° C agregándole Hidróxido de sodio y acetona.

Una vez hecho esto se realizaron las pruebas de especificidad y precisión; se seleccionó y/o adecuó el método de muestreo que mejor se adaptó a la recolección de polvos de acuerdo a las características de los antibióticos; integrándose ambos métodos para finalmente probarlos en las áreas de producción.

1. Precisión y sensibilidad del método (I) colorimétrico para detectar ampicilina

Objetivo: Determinar la sensibilidad y precisión de la formación del complejo colorido fierro-hidroxilamina con observaciones visuales.

SOLUCIONES REACTIVO (METODO I)

DESCRIPCION	PREPARACION
Cloruro de hidroxilamina al 0.03%	Disolver 3.5 gr. de cloruro de hidroxilamina en agua suficiente para 100 ml.
Solución reguladora de pH 7	Disolver 17.3 gr. de Hidróxido de sodio y 2.06 gr. de acetato de sodio en 100 ml. de agua destilada.
Hidroxilamina neutra	Mezclar un volumen igual de cada una de las soluciones anteriores, checar el pH y si es necesario ajustar a pH 7.0 + 0.1 adicionando uno de los componentes. A un volumen de esta Solución neutralizada adicionar 8 volúmenes de agua destilada y dos volúmenes de etanol al 95% esta Solución deberá usarse el mismo día solamente.
Sulfato Férrico amoniacal al 0.2%	Disolver 27.2 gr de sulfato Férrico amoniacal en una mezcla de 2.0 ml. de ácido sulfúrico y suficiente agua destilada para 100 ml. este reactivo se puede usar por una semana cuando se guarda en un frasco color ámbar a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO

a. Colocar 10 mg. de ampicilina trihidratada en un matraz aforado de 100 ml, diluir con agua destilada hasta la marca y agitar la Solución (Solución stock de 100 ppm).

b. De la Solución anterior (stock) tomar 1 ml y diluirlo a 10 ml (10 ppm), hacer dos diluciones más de la misma forma para obtener las siguientes concentraciones: 1 ppm, 0.1 ppm.

c. Marcar 12 tubos con la concentración anteriores, tres veces cada una.

d. Tomar (por triplicado) 1 o 2 ml de las diluciones en los tubos de ensayo correspondientes y adicionarles un volumen igual de agua.

e. Adicionar los siguientes reactivos en la proporción volumétrica especificada con respecto a la Solución problema o estandard:

f. 1.25 volúmenes de reactivo hidroxilamina neutra, dejar reaccionar por 5 minutos.

g. Adicionar 1.25 volúmenes de reactivo sulfato Férrico amoniacoal al 0.2% y mezclar.

h. Determinar en que dilución se observa diferencia con un blanco de reactivos preparada con un volumen de agua y un tratamiento igual al de punto f y g.

RESULTADOS

TABLA 2 Respuestas del método (I) colorimétrico para ampicilina con analistas y concentraciones diferentes

analista	día	replicación	concentración (ppm)				
			103	10.3	1	0.1	
1	1	1	++	-	-	-	
		2	++	-	-	-	
		3	++	-	-	-	
	2	1	1	++	-	-	-
			2	++	-	-	-
			3	++	-	-	-
		2	1	++	-	-	-
			2	++	-	-	-
			3	++	-	-	-
2	2	1	++	-	-	-	
		2	++	-	-	-	
		3	++	-	-	-	

++ Diferencia visual perceptible entre el blanco y muestra.

+ Pequeña diferencia visual entre el blanco y muestra.

- No se observa diferencia entre el blanco y la muestra.

Tabla 3. Respuesta del método colorimétrico para ampicilina con diferentes lotes de reactivo y días.

Reactivo lote	día	replicación	concentración (ppm)			
			103	10.3	1	0.1
A	1	1	++	-	-	-
		2	++	-	-	-
		3	++	-	-	-
	2	1	++	-	-	-
		2	++	-	-	-
		3	++	-	-	-
	1	1	++	-	-	-
		2	++	-	-	-
		3	++	-	-	-
B	2	1	++	-	-	-
		2	++	-	-	-
		3	++	-	-	-

++ Percepción visual de color rojo

- No se observa diferencia entre blanco y muestra

Discusión de resultados

La sensibilidad del método para ampicilina se probó con diluciones sucesivas de una solución stock y aunque la sensibilidad no es adecuada para detectar trazas de ampicilina en el ambiente el tratamiento de la muestra se adaptó al método de muestreo, esto es, se maneja en solución a diferencia del métodos I y II, anteriores, que requiere la muestra en estado sólido, lo cual es difícil obtener con las técnicas de muestreo, pues son sólo trazas las que se van a detectar.

Debido a que el método es sólo cualitativo, es decir, determinar la presencia o ausencia del antibiótico en el medio ambiente, los parámetros de linealidad, ordenada al origen y exactitud no es necesario evaluarlas, además para ello se requieren valores numéricos, por lo tanto, quedan fuera del alcance de este trabajo. Las tablas 2 y 3 muestran los resultados de esta prueba y de reproducibilidad, la cual se realizó con analistas, lotes de reactivo y días diferentes comprobándose de esta manera que el método es preciso y su sensibilidad es de 100 ppm.

Las principales limitantes del método son el hecho de que el ojo humano no puede analizar colores, es decir, le es imposible diferenciar entre un cierto verde; además de la sensibilidad y los errores inherentes que tienen las determinaciones visuales, como son la capacidad del analista para diferenciar o detectar los colores, la iluminación del lugar donde se realice el análisis, etc.

2. Precisión y sensibilidad del método (II) para detectar cefalexina

Objetivo: Determinar la precisión y sensibilidad de la reacción colorimétrica por observaciones visuales.

SOLUCIONES REACTIVO (METODO II)

DESCRIPCION

OPERACION

Hidróxido de sodio al 1,3%

Diluir 13 gr. de Hidróxido de sodio en 1000 ml. de agua.

Solución reguladora pH 7

Colocar 50 ml de Solución fosfato de potasio monobásico 0,2 M en un matraz de 200 ml y adicionar 29 ml de Solución Hidróxido de sodio, aforar a 200 ml (USP XXI pp 1010).

PROCEDIMIENTO

- a. Pesar 0.0010 g. de cefalexina y diluirlo con agua en un matraz aforado de 10 ml (100 ppm).
 - b. Tomar 1 ml. de la Solución anterior y aforar a 10 ml (10 ppm).
 - c. Realizar la misma operación del paso b para obtener las siguientes concentraciones (1 ppm, 0.1 ppm).
 - d. Transferir 2.0 ml de las diluciones anteriores a tubos de ensayo marcados con las concentraciones correspondientes.
 - e. Adicionarles 0.5 ml. de hidróxido de sodio y 0.3 ml. de acetona.
 - f. Mezclar y cubrir los tubo con papel parafilm.
 - g. Colocarlos en un baño de agua hirviendo, por 3 minutos.
 - h. Preparar un blanco con 2 ml. de agua y darle el mismo tratamiento a partir del paso (e).
 - i. Comparar los tubos de ensayo con el blanco y determinar hasta que dilución se observa la coloración roja.
 - j. Probar las siguientes modificaciones y hacer las observaciones como en el paso anterior. (sol. reg. = Solución reguladora pH 7).
1. 2 ml de muestra + 1 ml de sol. reg. + 0.5 ml de acetona + 1 ml de NaOH ---3 min, 95°C-->
 2. 2 ml de muestra + 1 ml de sol. reg. + 0.5 ml de acetona ---3 min, 95°C,--> + 1 NaOH
 3. 2 ml de muestra + 1 ml de sol. reg. + 0.5 ml de acetona + 2 ml NaOH ---70°C, 3hrs --->
 4. 2 ml de muestra + 2 ml de sol. reg. + 1 ml NaOH + acetona ---70°C, 3 hrs---> + 1 ml de NaOH
 5. 2 ml de muestra + 1.5 ml de s. reg. + 0.5 ml HCl --70°C, 3 hrs--->

RESULTADOS

TABLA 4 Respuestas del método (II) colorimétrico para cefalexina con diferentes analistas y concentraciones

Analista	Día	Replicación	CONCENTRACION (PPM)						
			400	40	4	0.4	100	10	1
1	1	1	++	+	-	-			
		2	++	+	-	-			
		3	++	+	-	-			
	2	1					+	+	-
		2					+	+	-
		3					+	+	-
	1	1	++	+	-	-			
		2	++	+	-	-			
		3	++	+	-	-			
2	1					+	+	-	
	2					+	+	-	
	3					+	+	-	

++ Diferencia visual significativa entre el blanco y muestra.

+ Aún se detecta diferencia visual entre el blanco la muestra.

- No se observa diferencia entre el blanco y la muestra.

TABLA 5

Respuesta del método colorimétrico para cefalexina modificando el orden de adición de los reactivos.

CONCENTRACION	MODIFICACION					
	0	1	2	3	4	5
400	++	++	++	+	+	
40	++	+	+	-	-	
4	-	-	-	-	-	
180	++	++			-	-
18	+	+			-	-
1.8	-	-			-	-

++ Diferencia visual significativa entre el blanco y la muestra

+ Diferencia visual entre el blanco y la muestra

- No se observa diferencia entre el blanco y la muestra

Discusión de resultados

Para la cefalexina en el rango de concentración 400 a 100 ppm se observó claramente la diferencia entre el blanco y la muestra, sin embargo a partir de aquí, la intensidad del color va disminuyendo hasta 10 ppm, abajo de esta concentración fue difícil observar visualmente la diferencia entre el blanco y el problema (tabla 4).

En un intento de aumentar la sensibilidad se probó el efecto del pH y la adición de reactivos. Para el primero caso se preparó una solución amortiguadora de pH 7 (USP XXI pp 1100) la cual se adicionó al procedimiento original y, como puede observarse en la tabla 5 al compararla con el procedimiento original (reacción 0), sin ninguna modificación, el efecto en aumentar la sensibilidad no fue significativo. También se sometió una muestra durante 3 hrs. a 70° C, pero la sensibilidad tampoco mejoró; de igual manera se hizo con HCl con idénticos resultados. En cuanto al orden de adición de reactivos, las formas probadas disminuyeron la sensibilidad, por lo que se mantuvieron las condiciones y el procedimiento original.

Los datos para evaluar la reproducibilidad y repetibilidad de los métodos se presentan en la tabla 4. En ella se observa que con diferentes días y analistas el método es reproducible.

Para detectar la cefalexina es necesario tomar en cuenta el tiempo que dure la Observación ya que el cromoforo formado no es muy estable. Experimentalmente a concentraciones de 100 ppm aun persiste el color después de 1 hora y es posible diferenciar claramente el blanco de la muestra; aunque en la bibliografía [P]reportan una estabilidad de 30 minutos.

3. Especificidad de cada método para detectar ampicilina y cefalexina.

Objetivo: determinar la especificidad de cada método para detectar ampicilina y cefalexina

PROCEDIMIENTO

a. Preparar las siguientes concentraciones de ampicilina 150, 100 y 5 ppm; cefalexina 150, 25 y 5 ppm

b. Colocar 2 ml. de cada concentración en tubos de ensayo y tratar cada muestra con los métodos descritos anteriormente como se indica: Ampicilina - Método II; Cefalexina-Método I

c. Observar la coloración producida y la concentración en la que se distingue una diferencia con el blanco.

d. Colocar por duplicado en diferentes tubos de ensayo 2 ml de soluciones que contenga uno de los siguientes excipiente: lactosa, estearato de magnesio y almidón.

e. Tratar una serie de las muestras con el método I y la otra serie con el método II, descritos anteriormente [53,57].

RESULTADOS

TABLA 6 Respuesta de los métodos I y II ante: lactosa, estearato de magnesio y almidón

	Excipiente		
	Lactosa	Almidón	Estearato de magnesio
Método I	-	-	-
Método II	-	-	-

(-) No hay interferencia

TABLA 7. Respuesta de los métodos al invertir los antibióticos

repetición	CONCENTRACION EN PPM						
	Ampicilina			Cefalexina			
	150	100	5	150	25	5	
Método I	1	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	-	-	-	-
Método II	1	+	+	-	+	+	-
	2	+	+	-	+	+	-
	3	+	+	-	+	+	-

+ Coloración

- No hay respuesta (coloración)

Discusión de resultados

En la especificidad de los métodos se tomaron en cuenta dos criterios: 1) especificidad ante excipiente; y 2) especificidad entre los mismos antibióticos. Para el primer criterio, se eligieron sólo tres de los excipiente más frecuentemente usados en el área de producción del laboratorio farmacéutico que pudieran interferir en la reacción del método de detección, como el estearato de magnesio, el almidón y la lactosa, repitiendo la prueba tres veces para cada método. En la tabla 6 se observa que el método I no da respuesta con los excipiente probados por lo que el método es específico; el Método II presentó una ligera coloración amarilla con lactosa, al compararla con el blanco de reactivos, diferente a la coloración roja de la cefalexina, por lo que el método es específico.

El segundo criterio se evaluó entre ampicilina y cefalexina para poder conocer las posibilidades de elegir entre ambos métodos, si es necesario, por falta de algún reactivo o reducir tiempo de análisis por ello se invirtieron los antibióticos, o sea que, con el método I para ampicilina se ensayó cefalexina y viceversa. Observándose que la hidrólisis alcalina (método II) también detecta ampicilina y el método I de hidroxilamina detecta cefalexina pero no con la misma sensibilidad.

El método I con hidroxilamina detecta concentraciones de cefalexina de más de 150 ppm. El método II detecta ~120 ppm de ampicilina (tabla 7). Por lo que es posible usar el método II para ambos antibióticos, simplificando así el método de análisis.

D. TECNICAS DE MUESTREO

Objetivo: Determinar si existe interferencia de los instrumentos de muestreo con los reactivos del método analítico y comprobar la sensibilidad del método de muestreo total.

1. Muestreo de superficie

a. Sumergir el muestreador de superficie (Apéndice II) en 10 ml de agua durante 5 minutos.

b. Tomar 2 ml del paso anterior y someterla al procedimiento analítico descrito anteriormente para detectar cefalexina o ampicilina.

c. Determinar si los componentes del muestreador interfieren con el método analítico (prueba blanco).

d. Tomar 2 ml de una Solución que contenga 1 mg/ml de cefalexina (o 150 mg/ml ampicilina) y distribuirla dentro del área que marca la plantilla de una superficie limpia.

e. Dejar que se seque la muestra durante 15 minutos.

f. Humedecer la esponja del muestreador en 10 ml de agua.

g. Limpiar la superficie donde se colocó la muestra.

h. Enjuagar la esponja con 10 ml de agua cuatro veces.

i. Recolectar las soluciones anteriores y aforar a 50 ml.

j. Tomar 2 ml de la muestra y someterla al método analítico correspondiente para detectar ampicilina o cefalexina.

k. Corregir la cantidad mínima que detecta el método utilizando un blanco de agua.

2. Muestreo de aire

a. Enjuagar cada uno de los componentes del muestreador (Apéndice I) con 10 ml de agua.

b. Tomar 2 ml del agua utilizada y someterla al procedimiento del método analítico I o II descritos en la página 53,57.

c. Evaluar que los componentes del muestreador no interfieren con el método analítico (prueba blanco).

d. En un vaso de precipitado colocar 10 mg del fármaco a muestrear.

e. Extraer durante 10 minutos el fármaco con el muestreador ambiental a 20 litros por minuto (LPM).

f. Limpiar cada uno de los componentes del muestreador con agua.

g. Determinar la eficacia del muestreador ambiental.

RESULTADOS

TABLA 8

Resultado de los diferentes componentes del muestreo ambiental

	METODO I (AMPICILINA)		METODO II (CEFALEXINA)	
	Sin muestra (pb. b anco)	Con muestra	Sin muestra (pb. blanco)	Con muestra
cartucho	-	++	-	++
portafiltros	-	+	-	+
filtro	-	++	-	++
manguera	-	-	-	-
muestreador de superficie	-	++	-	++

++ Detección del antibiótico

- No hay detección de antibiótico

TABLA 9.

Sensibilidad del método de muestreo de superficie

procedimiento	Concentraciones (ppm)						
	150	100	50	:	25	20	15
Método I (ampicilina)	+	-	-	:			
Método II (cefalexina)				:	+	-	-

(+) Diferencia entre el blanco y la muestra

(-) Blanco y muestra iguales

Discusión de resultados

Los métodos de muestreo ambiental (superficie y aire) se seleccionaron de acuerdo a las propiedades del polvo principalmente el hecho que la penicilina se usa comúnmente como un polvo seco muy fino que migra fácilmente al ser transportado por el aire [62], su solubilidad y adherencia al equipo.

En base a estas características se eligió el muestreo de superficie con pruebas de contacto y el primer parámetro que se evaluó, fue establecer que los instrumentos del muestreo no reaccionan con los reactivos del método de análisis. Estas pruebas blanco se hicieron con la plantilla y el muestreador de superficie, al no observar interferencia nuevamente se probó la sensibilidad, fijando un área de 100 cm² por cada punto de muestreo, con la plantilla cuadrada de 10 X 10 cm y deslizando una esponja fija en un soporte duro con extensión para poder manipularlo. De esta manera el área de muestreo es constante (aunque no se use para cuantificar). Para ambos métodos la sensibilidad disminuyó a 150 ppm para ampicilina y 25 ppm para cefalexina, lo cual ayudó a determinar la efectividad del método al limpiar la superficie, ya que, los instrumentos pueden retener parte del antibiótico, o hacer una recolección incompleta.

Para el muestreo de aire se eligió la técnica de filtración para particular en suspensión porque durante el proceso de tableteo,

mezclado y acondicionamiento se esparce en el ambiente polvo con principio activo el cual al estar suspendidos en el aire es posible capturarlos en un filtro al ser atraídos por una bomba de vacío. Los resultados (tabla 8) de las pruebas blanco, mostraron que no hay interferencia con los reactivos y las diferentes partes del muestreador, por lo tanto, se procedió a probarlo con muestra. Aquí se observó que los antibióticos quedaron retenidos principalmente en el papel filtro, prefiltro y cartucho estableciendo así que es efectivo para el muestreo de los antibióticos por lo que se procedió a probarlo en áreas de producción.

E. PRUEBAS EN LAS AREAS DE PRODUCCION

Objetivo : Establecer y probar la utilidad del método de muestreo ambiental para ampicilina y cefalexina en las áreas de producción.

PROCEDIMIENTO

- a. Hacer un diagrama del área a donde se va muestrear.
- b. Seleccionar los puntos de muestreo.
- c. Colocar la plantilla en la superficie a muestrear.
- d. En un vaso de precipitado colocar 10 ml de agua deionizada, humedecer la esponja del muestreador.
- e. Limpiar las superficies donde se colocó la plantilla cubriendo completamente el área marcada.
- f. Enjuagar cuatro veces la esponja con porciones de 10 ml cada enjuague coleccionarlo en un matraz de 50 ml para cada esponja, agitar.
- g. Trasvasar 2 ml de la Solución anterior en un tubo de ensayo
- h. Tratar la muestra y un blanco de 2 ml. de agua de la siguiente manera :
 - h1. Adicionar 0.5 ml. de NaOH al 15 % w/v y 0.3 ml de acetona.

-
- h2. Tapar la muestra con papel parafilm.
 - h3. Colocar los tubos en un baño de agua hirviendo (95° C) tres minutos.
 - h4. Comparar los tubos de las muestras con el blanco.
 - i. Con el muestreador ambiental Staplex extraer el área de producción muestras de aire.
 - j. Lavar los diferentes componentes del muestreador con agua y tratarlos como se indica en el paso h.
 - k. Determinar los puntos contaminados en las diferentes áreas

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

PLANOS DE LOCALIZACION DE PUNTOS DE MUESTREO EN AREAS
DE PRODUCCION

GRUPO APLICACIONES FARMACÉUTICAS S. A.

GERENCIA DE CONTROL DE CALIDAD

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION

PLANO 1	AREA DE PESO
PLANO 2	AREA DE MEZCLADO
PLANO 3	AREA DE ENCAPSULADO
PLANO 4	AREA DE LIMPIEZA DE CÁPSULAS
PLANO 5	AREA DE FUNDACION

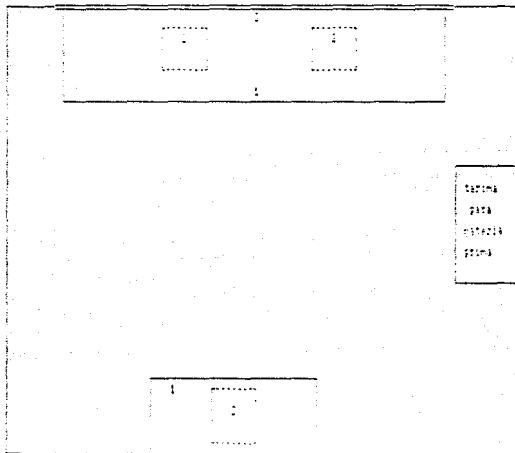
PLANO DE LOCALIZACION DE PUNTOS DE MUESTREO

GRUPO APLICACIONES FARMACEUTICAS S.A.

GERENCIA DE CONTROL DE CALIDAD

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION DE SOLIDOS

PESO DE MATERIA PRIMA



ENCUENTRO DE PUNTO DE MUESTREO
1. PUNTO DE MUESTREO
2. PUNTO DE MUESTREO
3. PUNTO DE MUESTREO

LEGENDA

- PARED
- PUERTA
- JENTANA
- BALANZA

REALIZO
FACIO FLORES SANTAMARIA

PLANO 1
AREA DE PESO

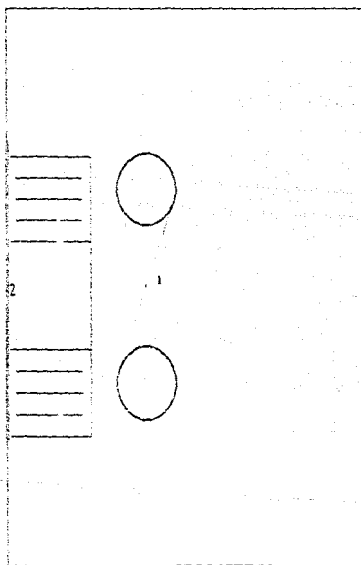
PLANO DE LOCALIZACION DE PUNTOS DE MUESTREO

GRUPO APLICACIONES FARMACEUTICAS S.A.

GERENCIA DE CONTROL DE CALIDAD

DEPARTAMENTO DE PRODUCCION DE SOLIDOS

AREA DE MEZCLA DE SOLIDOS



PLANO DE MUESTREO DE LA ZONA DE MEZCLA DE SOLIDOS

SIMBOLOGIA

- PARED
- PUERTA
- VENTANA

REALIZO

ROCIO FLORES SANTAMARIA

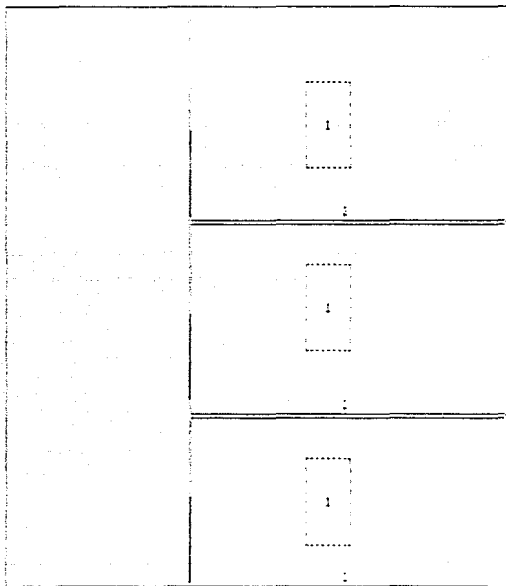
PLANO 2

AREA DE MEZCLA

PLANOS DE LOCALIZACION DE PUNTOS DE MUESTREO

GRUPO APLICACIONES FARMACEUTICAS S.A.
GRUPO DE CONTROL DE CALIDAD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION DE SOLIDOS

AREA DE ENCAPSULADO



PLANOS DE MUESTREO: ENCAPSULADOR
ENCAPSULADO

LEGENDA

— PARED

— MESA

— VENTANA

--- ENCAPSULADORA

ENCICLO

ENCICLO FLORES BANCARIA

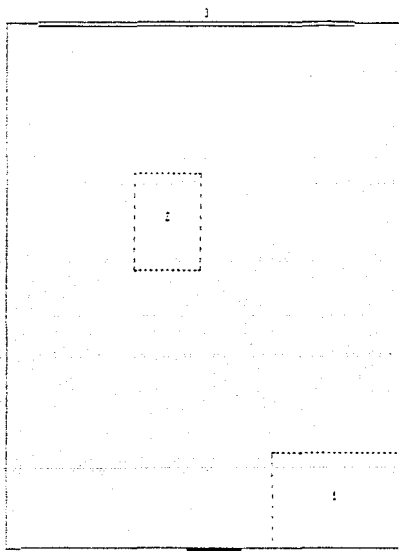
PLANO 1

AREA DE ENCAPSULADO

PLANOS DE LOCALIZACION DE PUNTOS DE MUESTREO

GRUPO APLICACIONES FARMACÉUTICAS S.A.
GERENCIA DE CONTROL DE CALIDAD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION DE SÓLIDOS

AREA DE LIMPIEZA DE CAPSULAS



PUNTO DE MUESTREO: 1 MESA
2 EXTRACTOR AEROSOLIZ
3 VENTANA

SIMBOLOGIA

— PARED
— PUERTA
--- VENTANA

REALIZO

ROCIO FLORES SANTAMARIA

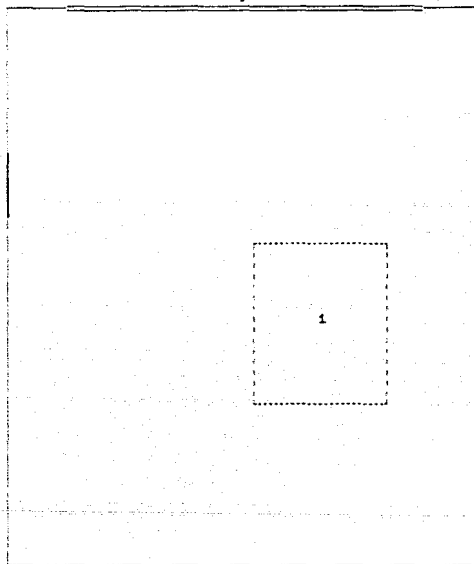
PLANO 1

AREA DE LIMPIEZA DE CAPSULAS

PLANO DE LOCALIZACION DE PUNTOS DE MUESTREO

GRUPO APLICACIONES FARMACEUTICAS S.A.
OFICINA DE CONTROL DE CALIDAD
DEPARTAMENTO DE PRODUCCION DE SOLIDOS

AREA DE GRANULACION



PUNTOS DE MUESTREO: 1 GRANULADOR
2 VENTANA

SIMBOLOGIA

- PARED
- PUERTA
- VENTANA
- GRANULADOR

REALIZO

ROCIO FLORES SANTAMARIA

PLANO 1

AREA DE GRANULACION

RESULTADOS

TABLA 10

Resultado de las pruebas realizadas en las diferentes áreas de producción de ampicilina y cefalexina

AREA DE PRODUCCION	PUNTOS DE MUESTREO	NUMERO DE PRUEBA		
		1	2	3
Peso	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
Granulación	1	-	-	-
	2	-	-	-
Mezclado	1	-	-	-
	2	-	-	-
Encapsulado	1	-	-	-
	2	-	-	-
Limpieza de cápsula	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-

(-) Prueba negativa. No hay más de 0.0375 mg de ampicilina por litro de aire (62 UI/Li) o en 100 centímetros cuadrados de superficie. No hay más de 0.0075 mg de cefalexina por litro de aire (12 UI/Li) o en 100 cm² en las áreas de muestreo. Los puntos de muestreo son los que se localizan en los planos del área correspondiente.

Discusión de resultados

Al hacer las pruebas en las áreas de producción: peso, mezclado, llenado y limpieza de cápsulas, los puntos de muestreo en superficies (paredes, equipo y ventanas) se eligieron por la dificultad de su limpieza, ya que, en la producción de formas farmacéuticas sólidas es particularmente difícil limpiar con facilidad el equipo empleado en su fabricación, porque el fármaco se adhiere electrostáticamente al equipo de proceso [63], además, el peso de una tableta es aproximadamente 70 mg ingrediente activo, lo que da un alto rendimiento de penicilina en el polvo producido en la operación de tableteo [55]. Algunos puntos de muestreo del equipo no se puede limitar al área de la plantilla porque su superficie no es plana, sin embargo esto no es importante por que el método no es cuantitativo.

En aire se hizo un recorrido del área con el muestreador Staplex durante 10 minutos a 20 LPM en áreas que fueron utilizadas para producir beta lactámicos de esta manera se probó que en las diferentes áreas de producción no existen más de 12 UI m³ de cefalexina o 62 UI de ampicilina por litro de aire o por 100 centímetros cuadrados de superficie muestreada. El tiempo aproximado de la prueba fue de 20 minutos.

En esta fase del diseño el método de muestreo ambiental para detectar ampicilina y cefalexina en áreas de producción queda propuesto como un primer parámetro de control interno en áreas de producción que indica la presencia del antibiótico en el ambiente para tomar las medidas necesarias con el fin de evitar que se diseminen en la planta contaminando a otros medicamentos

V CONCLUSIONES

El método de muestreo ambiental diseñado permite monitorear constantemente en aire y superficie ampicilina y cefalexina, para evitar que los lotes manufacturados en áreas adyacentes a ella se contaminen durante su fabricación.

El método total hasta la obtención de resultados requiere aproximadamente 20 minutos

SUGERENCIAS

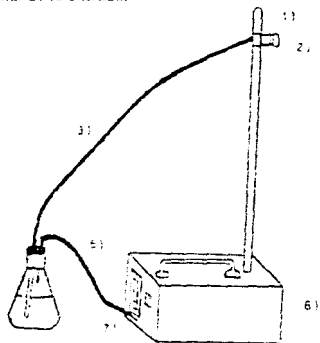
El método sólo funciona como un primer indicador de la presencia de ampicilina o cefalexina en el ambiente, por ello deben hacerse pruebas adicionales para confirmar la contaminación del medicamento, cuando las pruebas sean positivas (+). Las pruebas colorimétricas deben observarse en un período máximo de una hora

Se puede usar sólo el método (II) de hidróxido de sodio al 13% para detectar ambos antibióticos.

APENDICE I MUESTREADOR DE AIRE (STAPLEX VM 03)

Componentes

- 1) Válvula de control de flujo de 3-25 litros por minuto (LPM)
- 2) Tubo flexible con adaptador de entrada para porta filtro
- 3) Interruptor de encendido y apagado.
- 4) Cromómetro digital: Sirve para programar el tiempo en el cual se inicia y termina el muestreo.
- 5) Cajas de filtro y filtros. Portador de filtro compuesto de 3 piezas, filtro mezcla de esteres de celulosa con poro de 0.8 micras, soporte al final de la entrada.



1) Porta filtro o adaptador de entrada, compuesta de tres piezas (en la parte superior se coloca el filtro y en la parte inferior se conecta el tubo flexible del muestreador ambiental).

2) Filtro mezclador.

3) Tubo flexible con adaptador de entrada.

4) Manguera para vacío.

5) Cronómetro.

6) Muestreador ambiental, Stajlex

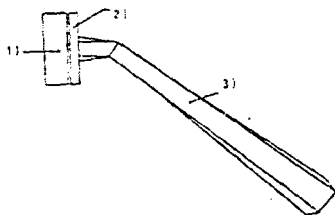
figura tomada de la referencia 100

APENDICE II MUESTREADOR DE SUPERFICIE (CONTACTEL)

El muestreador de superficie consta de dos implementos que son:

1) Esponja de 2x2 cm con una tira de contactel y la contraparte se une en la base de acrílico de 2.5x2.5 cm la cual va unida a una asa de plástico (figura).

2) Plantilla de plástico cuadrada de 15x15 cm y en el centro de 10x10.



1) Esponja de 2x2 cm con una tira de contactel.

2) Base de acrílico de 2.5x2.5 cm con la contraparte de contactel.

3) Asa de plástico.

Muestreadores empleados para el muestreo en superficie

figura tomada de la referencia 100

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- A. Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura, "Guía de procedimientos adecuados de manufactura farmacéutica"; 2da. ed. México, 1986, p. 32.
- B. A.Saxon, "Immediate Hypersensitivity Reactions to beta-Lactam Antibiotics", *Reviews of Infectious Diseases*; 5:2, mayo-junio 1983.
- C. Flor de Guadalupe H.R., "Aspectos Regulatorios sobre beta lactámicos"; Curso de Beta - Lactámicos, México, D.F., Julio 9-11; 1990, pp 1F-4F.
- D. Fundenberg H.H.: "Manual de Inmunología Clínica", 5a. ed. El Manual Moderno, S.A., México D.F., 1986.
- E. J. Kumate, "Antibióticos y Quimioterapéuticos", Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México, p. 112, 1979.
- F. Flaum I. "Contamination of Pharmaceutical Products", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67 (1) 1978.
- G. H. Welch, "Principios básicos de la terapia antibiótica", Medical Enciclopedia, INC., New York, N.Y., 1955, pp 4-8.
- H. Leonardo de la Peña M. "El punto de vista farmoquímico". Curso de beta-lactámicos, México, D.F., julio 9-11, 1990.
- I. D. W. Young, "Heterocyclic Chemistry", Longman, Londres, pp. 120-121, 1975.
- J. K. Florey, "Analytical Profile of Drug Substances", Academic Press, New York, V.2, pp. 44-46.
- K. E.G.C. Clarke, "Isolation and identification of drug in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material", 2da. ed. The Pharmaceutical Press, Londres, pp 35-36, 1986.
- L. FDA by-lines No. 3, "Penicillin Contamination in Foods and Drugs", noviembre (1977).
- M. Willar, H.H., Merritt, L.: "Metodos instrumentales de Analisis", 15a., Compania Editorial Continental S.A. de C.V., Mexico, D.F. pp 716-144.

- N. E. P. Dean, AIR POLLUTION TECHNOLOGY, Reston Publishing Company, Inc., Virginia EEUU, pp 95-129, 1974.
- P. Marrelly, P.L. "Colorimetric estimation of cephalixin, cephaloglycin, and related compounds"; J. Pharm. Sci. 60: 10 octubre de 1972; pp 1647-1648.

REFERENCIAS

1. Mitchison, N. A. Antigen recognition responsible for the induction in vitro of the secondary response. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 32:431-439, 1967.
2. Levine, B.B. Immunologic mechanisms of penicillin allergy: a haptenic model system for the study of allergic diseases of man. N. Engl. J. Med. 275: 1115-1125, 1966.
3. Levine, B.B., Ovary, Z. Studies on the mechanism of the formation of the penicillin antigen. III. The N-(D-alfa-benzylpenicilloyl) grup as an antigenic determinant responsible for hypersensitivity to penicillin G. J. Exp. Med. 114: 875-904, [96].
4. Siegel, B.B., Levine, B.B. Antigenic specificities of skin-sensitizing antibodies in sera from patients with immediate systemic allergic reactions to penicillin, Journal of Allergy 35: 488-498, 1964.
5. Levine, B. B., Price, V. H. Studies on the immunological mechanisms of penicillin allergy. II. Antigenic specificities of allergic wheal-and-flare skin responses in patients with histories of penicillin allergy. Immunology, 7:542-556, 1964.
6. Levine, B. B., Redmond, A.P., Feilner, M.J., Voss, H.E., Levytska, V. Penicillin Allergy and The Heterogenous immune responses of man to benzylpenicillin. J. Clin. Invest. 45:1895-1906, 1966.
7. Juhkin, L., Ahlstedt, S., Andal, L., Ekdstrom, B., Svard, P. O., Wide, L. Antibody reactivity in penicillin-sensitive patients determined with different penicillin derivatives. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 54:19-28, 1977.

Bibliografia

8. Dewdney, J. M. Immunology of the antibiotics. In M. Sela [ed.]. The antigens. IV, Academic Press, New York, 1977, p. 72-245.
9. Ahlsted, S., Kristofferson, A., Pettersson, E. Antigens in penicillin allergy. III. Antigen and antibody levels in mice treated with pure contaminated penicillins. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* 58:20-29, 1979.
10. Kristofferson, A., Ahlstedt, S., Hall, E. Antigens in penicillin Allergy. IV. Induction of IgE Antibody response in mice after daily treatment with contaminated but not with pure penicillin. *Int. Arc. Allergy Appl. Immunol.* 60:295-301, 1979.
11. Ahlstedt, S., Kristofferson, A., Hall, E. Antigens in penicillin allergy. V On the relative allergenic potency of antigens carrying penicilloyl determinants derived from azidocillin, ampicillin, and benzyipenicillin. *Int. Arc. Allergy Appl. Immunol.* 61:91-99, 1980.
12. Weinstein, L. Antibiotics I. The penicillins. In L. S. Goodman and A. Gilman [ed.]. *The Pharmacological basis of therapeutics*. 4th ed. MacMillan, Toronto, 1970, p. 1204-1241.
13. Guthe, T., Idsoe, O., Wilcox, R. R. Untoward penicillin reactions. *Bull. WHO* 19:427-501, 1958.
14. Idsoe, O., Guthe, T., Wilcox, R. R., DeWeck, A. Nature and Extent of penicillin side-reactions, with particular reference to fatalities from anaphylactic shock. *Bull WHO* 38:159-188, 1968.
15. Siegel, B. B. Hidden contacts with penicillin. *Bull WHO* 21:703-713, 1959.
16. Fellner, M. J., Klaus, M. V., Bear, R. L., Rausen, A. R. Antibody production in normal children receiving penicillin at birth. *J. Immunol.* 107:1440-1447, 1971.
17. Gally, J. A. The structure, genetics and biological properties of immunoglobulins. In M. Samter [ed.]. *Immunological diseases*. 1. 3rd. ed. Little, Brown, Boston, 1978, p. 49-80.
18. Stember, R. H., Levine, B.B. Prevalence of allergic diseases, penicillin hypersensitivity, and aeroallergen hypersensitivity in various populations [abstract no.46]. *J. Allergy Clin. Immunol.* 51:100, 1973

19. Green, G. R., Rosenblum, A. Report of the Penicillin Study Group; American Academy of Allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 48:331-343, 1971.
20. Warrington, R. J., Tse, K. S., Sehon, A. H. Drug hypersensitivities with special reference to penicillin. In M. K. Bach [ed.], *Modern concepts and developments in immediate hypersensitivity*. Marcel Dekker Publishers, New York, 1978, p. 749-778.
21. Van Dellen, R. G., Glach, G. J. Penicillin skin tests as predictive and diagnostic aids in penicillin allergy. *Med. Clin. North Am.* 54:997-1007, 1970.
22. Finke, S. R., Grieco, M. H., Connell, J.T., Smith, E.C., Sherman, W. B. Results of comparative skin tests with penicilloyl-polylysine and penicillin in patients with penicillin allergy. *Am. J. Med.* 38:71-82, 1965.
23. Levine, B.B., Zolov, I. M. Prediction of penicillin Allergy by immunological tests, *Journal of Allergy* 43:231-244, 1969.
24. Levine, B.B., Redmond, A.P., Voss, H.E., Zolov, D. M. Prediction of penicillin allergy by immunological tests. *Ann. NY Acad. Sci.*, 145:306-309, 1967.
25. Adkinson, N.F., Jr., Thompson, W.L., Maddrey, W.S., Lichtenstein, L.M. Routine use of penicillin skin testing on an inpatient service. *N. Engl. J. Med.* 285:22-24, 1971.
26. Green, G. R., Rosenblum, A. H., Sweet, L.C. Evaluation of penicillin hypersensitivity: value of clinical history and skin testing with penicilloyl-polylysine and penicillin G. *J. Allergy Clin. Immunol.* 60:339-345, 1977.
27. Warrington, R. J., Simons, F.E.R., Ho, H. W., Gorski, B.A. Diagnosis of penicillin allergy by skin testing: the Manitoba experience. *Can. Med. Assoc. J.* 118:787-791, 1978.
28. Croft, J. D., Jr., Swisher, S.N., Jr., Gilliland, B.C., Bakeimeier, R.F., Leddy, J.P., Weed, R.I. Combs test positivity induced by drugs: mechanisms of immunologic reactions and red cell destruction. *Ann. Intern. Med.* 68:176-187, 1968.
29. Bang, N.U., Kammer, R.B. Hematologic complications associated with beta-lactam antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 5 (Suppl. 2):S380-S393, 1983.

30. Cochrane, C.G., Dixon, F.J. Immune complex injury. In M. Samter [ed.], *Immunological diseases I*. 3rd ed. Little, Brown, Boston, 1978, p. 210-229.
31. DeSwarte, R.D., Drug Allergy. In R. Patterson (ed.), *Allergic diseases: and management*, 2da. ed J.B. Lippincott, Philadelphia, 198, pp452-583.
32. Petz, L.D. Immunologic reactions of human to cephalosporins. *Postgrad. Med. L. (Feb. Suppl)* 57:67-69, 1971.
33. Kabins, S.A., Eisenstein, B., Cohen, S. Anaphylactoid reaction to an initial dose of sodium cefalothin, *JAMA* 193:165-166, 1965
34. Sholand, J.F., Tennenbaum, J.L., Cerilli, G.J. Anaphylaxis to cephalothin in a patient allergic to penicillin. *JAMA* 205:130-132, 1968.
35. Abraham, G.N., Petz, L.D., Fudenberg, H.H. Immunohaematological cross-allergenicity between penicillin and cephalotin in human. *Clin. Exp. Immunol*, 54:65-74, 1968.
36. Spath, P., Garratty, Petz, L.D., Studies on the immune response to penicillin and cephalothin in humans. I Optimal conditions for titratio of hemagglutinating penicillin and cephalotin antibodies. *J. Immunol.* 107:854-859, 1971.
37. Spath, P., Garratty, C., Petz, L. D. Studies on the immune response to penicillin and cephalothin in humans II. Immunohematologic reactions to cephalothin administration. *J. Immunol.* 107:860-869, 1971.
38. Assem, S.K., Vickers, M. R. Tests for Penicillin allergy in man. II. The immunological cross-reaction between penicillins and cephalosporin. *Immunology* 27:255-269, 1974.
39. M.N. Lehnhard, "A Brief Legislative History of the Food, Drug, and Cosmetic Act." Committee Print No. 14, 93rd Congress, 2nd Session, 26 - 062, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1974, p. 24.
40. "The United States Pharmacopeia." 19th rev., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975.
41. "The National Formulary." 14th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1975.
42. L. Lachman y R. J. Lantz, Jr., *J. Mond. Pharm.*, 14, 90 (1971).

Bibliografía

43. H. Hellberg, "Contamination in the Manufacture of Pharmaceutical Products", Secretariat of the European Free Trade Association, Genova, Suecia, 1973, pp. 7-15.
44. G. Baumann, E.J. Rayfield, L. I. Rose, G.H. Williams, y J.F. Dingman, J. Clin. Endocrinal, Metab., 31, 801 (1972).
45. J. H. Perrin, "FDA Symposium on Safety of Large Volume Parenteral Solution Proceedings", Julio 1966, pp. 73-78.
46. W. J. Herlihy, *Anaesth Intensive Care*, 1, 240 (1973).
47. J. Bergman, "Contamination in the Manufacture of Pharmaceutical Products", Secretariat of the European Free Trade Association, Genova, Suiza, 1973, pp. 43-49.
48. L. Greenberg, *Bull. Parenter. Drug Assoc.*, 24, 157 (1970).
49. P.J. O'Neil, *Proc. Soc. Anal. Chem.*, 11, 30, (1974).
50. *Fed. Regist.*, 30 (19), 932, 933 (Enero 29, 1965).
51. "Code of Federal Regulations", Part 211.58j, Title 21, 1975.
52. C. M. Mitchell, *Bull. Parenter. Drug Assoc.*, 28, 146 (1974).
53. W. E. Walsh, H. Markowitz, J. D. Jones, y G. J. Gleich, *J. Allergy*, 47, 159 (1971).
54. P. P. Lamy, E.W. Parsons, Jr., y M. W. Kitler, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 26, 294 (1969).
55. J.H. Guill, Jr., *Bull. Parenter. Drug Assoc.*, 20, 151 (1966).
56. O. Molin, "Contamination in the Manufacture of Pharmaceutical Products", Secretariat of the European Free Trade Association, Genova, Suiza, 1973, pp. 33-41.
57. "Procedure for Detecting and Measuring Penicillin Contamination in Drugs", DHEW, FDA, Bureau of Scientific Standards and Evaluation,

Bibliografía

- Division of Antibiotics and Insulin Certification, Washington, D. C., Oct. 1965, and Addendum, 1967.
58. "The United States Pharmacopeia", 19th rev., Marek Publishing Co., Easton, Pa., 1975, p. 701.
59. F. W. Bowman y S. Holdowsky, J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed., 48, 95 (1959).
60. M. Moller, "Contamination in the Manufacture of Pharmaceutical Products", Secretariat of the European Free Trade Association, Genova, Suiza, 1973, pp. 25-31.
61. J.A. Kotaski, Contam. Control, 9, 10 (1970).
62. T.F. Aronson y P. Friedman, "Non-Contaminat Production of Liquid and Powder Drugs, A.D. 68-534", American Society of Tool and Manufacturing Engineers, Dearborn, Mich., 1968. p.8
63. A. L. Hanson y R.M. Shelley, Am. J. Hosp. Pharm., 31, 733 (1974).
64. J. A. Kotaski, Bull. Parenter. Drug Assoc., 25, 203 (1971).
65. G. Sykes, J. Mond. Pharm., 14, 8 (1971).
66. R. F. Schmitt, J. J. Brennan, and R. Berube, Bull. Parenter. Drug Assoc., 27, 15 (1973).
67. C. J. Endicott, R. Giles, y R. Pecina, "FDA Symposium of Safety of Large Volume Parenteral Solutions Proceedings", julio 1966 pp. 62-70.
68. N. J. Leonard, East Afr. Pharm J., 39, 53 (1972).
69. "Code of Federal Regulations", Parts 210 y 211, titulo 21, 1975.
70. S. H. Willing, M.M. Tuckerman, y W. S. Hitchings, IV, "Good Manufacturing Practices for Pharmaceuticals", Dekker, New York, N. Y., 1975.
71. A. N. Parisi y P. M. Borick, Contam. Control, 8 (1), 31 (1969).

Bibliografía

72. R. Ravin, J. Bahr, F. Luscomb, J. Gooch, S. Mutta, y S.D. Spittell, *Am. J. Hosp. Pharm.*, 31 340 (1974).
73. W.S. Miller y M.S. Korczynski, *Drug Cosmet. Ind.*, 110, 38 (1972).
74. T. G. Alexander, *Bureau By-lines*, 4, 81 (1963).
75. W. Alternschmidt y T. Liske, *Drugs Made Ger.*, 15, 11 (1972).
76. I. Sunsshine, "Hand book of Analytical Toxicology", CRF Press, Cleveland, Ohio, 1969, pp. 772-808.
77. E. G. C. Clarke y J. Berle, "Isolation and Identification of Drugs", Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra, 1969, pp 43-58, 637-655.
78. E. Stahl, "Thin-Layer Chromatography-A Laboratory Handbook", 2nd ed., Springer-Verlag, New York, N. Y., 1969.
79. G. Zweig y J. Sherina, "Handbook of Chromatography", vol I y II, CFR Press, Cleveland, Ohio, 1972, pp 89-189, 310-317, 437-467.
80. H. S. Kroman y S. R. Bender, "Theory and Application of Gas Chromatography in Industry and Medicine", Grune and Stratton, New York, N.Y., 1968.
81. B. Gudzinowicz, "Gas Chromatographic Analysis of Drugs and Pesticides", Dekker, New York, N.Y., 1967.
82. E.G.C. Clark y J. Berle "Isolation and Identification of Drugs", Pharmaceutical Press, Londres, Inglaterra, 1969, pp. 59-83.
83. B.J. Millard, *Adv. Drug Res.*, 6, 157 (1971).
84. G.R. Waller, "Biochemical Applications of Mass Spectrometry", Wiley-Interscience, New York, N. Y., 1972.
85. W. H. McFadden, III, "Techniques of Combined Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Applications in Organic Analysis", Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1973.

Bibliografia

86. H. T. Hopkins, Bureau By-Lines, 4, 7 (1963).
87. D. Taylor, "Neutron Activation and Activation Analysis", Van Nostrand Reinhold, New York, N. Y., 1964.
88. C.C. Fulton, "Modern Microcrystal Test for Drugs", Wiley Interscience, New York, N.Y., 1969.
89. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 12th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., 1975, pp 670-680.
90. A. Bracey, J. Pharm. Sci., 62, 1695 (1973).
91. E. Stahl, "Thin-Layer Chromatography-A Laboratory Workbook", 2nd ed., Springer-Verlag, New York, N.Y., 1969, p. 568.
92. "Millipore Application Procedure", A.P. 201, Millipore Corp. Bedford, Mass., 1973.
93. Millipore Pharm. Rev., 4,6 (1973).
94. M.A. Garth, H. Bryant, J. Kramer, and A. Kirshbaum, J. Pharm Sci., 60,63 (1971).
95. Herbst, D. Detection of residual ampicillin in tetracycline by bioautography. FDA By-lines 3, 114 (1974).
96. Herbst, D. Detection of residual ampicillin in demeclocycline and chlortetracycline. FDA By-lines 1, 1 (1975).
97. Burke, J.C. Penicillin blood levels obtained in dogs with oil-wax preparations of calcium penicillin and crystalline sodium and potassium penicillin G. Presented at the Conference of Antibiotic Research, Washington, DC, January 31 and February 1, 1947.
98. Code of Federal Regulations, Title 21, subparagraph 436.104, Government Printing Office, Washington, DC 20402, 1976.

Bibliografía

99. Biagi, G.L., Barbaro, A.M., Gamba, M.F., and Guerra, M.C. Partition data of penicillins determined by means of reverse-phase thin-layer chromatography. *J. Chromatogr.* 41, 371-379 (1969).
100. Rodriguez A.M.J.; "Validación Prospectiva para el control ambiental de Hidrocortisona durante el proceso de manufactura de hidrocortisona en cremas al 2.5%" pp 32, 34; Agosto de 1990, Mexico, D.F.
101. Herbst, D. Detection of penicillin G and ampicillin as contaminants in the tetracyclines and penicillamine. *J. Pharm. Sci.* (November 1977).
102. Anon., Fed. Regis. 30, 932-933 (Jan. 29, 1965).
103. Procedures for Detecting and Measuring Penicillin Contamination in Drugs. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Food and Drug Administration, Division of Antibiotic and Insulin Certification, Washington, DC, October 1965.
104. Herbst, D., Bryant, H., Anderson, B., and Weiss, P. Detection of various penicillins as contaminants in drugs. *FDA By-lines* 3, 111 (1974)