



COMPROBACION DE LA ESTERILIZACION DE  
CRISTALES CON OXIDO DE ETILENO

**MA. TERESA CECILIA LOPEZ FRANCO**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

1968



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

<b>PRESIDENTE</b>	<b>Prof. RAMON ULACIA ESTEVE</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Prof. GUADALUPE VELEZ PRATT</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>Prof. ETELVINA MEDRANO JAIMES</b>
<b>1er. SUPLENTE</b>	<b>Prof. MA. DE LOS ANGELES RODRIGUEZ</b>
<b>2do. SUPLENTE</b>	<b>Prof. MARIO A. MIRANDA CASTRO</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

**LABORATORIOS GRUPO ROUSSEL, S. A:**

<b>SUSTENTANTE</b>	<b>MA. TERESA CECILIA LOPEZ FRANCO</b>
<b>ASESOR DEL TEMA</b>	<b>RAMON ULACIA ESTEVE</b>
<b>SUPERVISOR TECNICO</b>	<b>MARIO A. MIRANDA CASTRO</b>

**▲ MIS PADRES**

Agradezco a Grupo Roussel  
el haberme permitido la -  
realización y conclusión-  
de este trabajo.

Con agradecimiento a mi maestro,  
Q.F.B. Ramón Ulacia Esteve por -  
su ayuda en el desarrollo de é-  
ste trabajo.

## **I N D I C E**

- I      INTRODUCCIÓN**
- II     GENERALIDADES**
- III    PLAN DE TRABAJO**
- IV    MATERIAL Y TÉCNICAS UTILIZADAS**
- V     TRABAJO EXPERIMENTAL**
- VI    RESULTADOS**
- VII   CONCLUSIONES**
- VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## **I N T R O D U C C I O N**



En la actualidad, la Tecnología permite el uso de sustancias sólidas estériles, muchas de las cuales son termolábiles y para poderlas esterilizar se ha recurrido al óxido de etileno. Existen varias dudas lógicas sobre la esterilidad de estos productos, dudas que tratan de eliminarse o comprobarse.

El presente trabajo se ha desarrollado bajo la suposición de que al ser cristalizada una sustancia en presencia de un microorganismo que se encuentre en la solución, éste puede servir como un factor para iniciar dicha cristalización, quedando ocluido dentro del cristal, o bien, dentro de un acúmulo de cristales.

Asimismo, se sabe que el óxido de etileno es un esterilizador de superficie y si dicho microorganismo se encuentra protegido por el cristal, la esterilización no será completa, obteniéndose como resultado un producto contaminado.

---

Esto tiene importancia sobre todo, en el caso de

fármacos cuya vía de administración es en forma -  
de suspensiones parenterales o de colirios, cuyos  
cristales pudieran llevar ocluidos microorganismos  
que no fueran detectables por ser insolubles en los  
medios de cultivo normalmente para -  
comprobar la esterilidad, como el caso de muchos  
esteroides.

## **GENERALIDADES**

Oxido de Etileno.

La aplicación de productos químicos en forma de gas o de vapor como agente esterilizante ha observado un auge en las últimas décadas, aunque los efectos letales del óxido de etileno fueron observados por primera vez por Cotton y Roark (1) en insectos usados para pruebas de fumigantes. De acuerdo con Phillips y Kaye (2) la primera referencia antibacterial fué encontrada por Schroder y Bossert en 1929. Esta acción bactericida fué utilizada comercialmente en 1930.

Los requisitos ideales para la esterilización con un gas son los siguientes: (3)

- a) No corrosivo
- b) No dañino a los materiales
- c) Penetrante
- d) Fácil de eliminar por ventilación
- e) De acción rápida
- f) ~~De baja toxicidad para humanos y animales~~
- g) No inflamable e inexplorivo

- h) Fácil de almacenar
- i) Fácil de manejar
- j) Disponible comercialmente
- k) Barato
- l) Bactericida, esporicida, virucida y fungicida en condiciones atmosféricas ordinarias

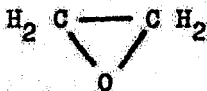
El óxido de etileno no reúne todas las cualidades como puede observarse más adelante, pero es ampliamente usado por su acción microbicida en sus estados líquido y gaseoso.

En forma líquida el óxido de etileno se ha empleado para la esterilización de medios de cultivo líquidos, sueros de caballo, emulsiones de aceite de oliva, soluciones de carbohidratos y soluciones de penicilina.

(4)

En forma de gas se ha empleado ampliamente en oftalmología (5), en la esterilización de envases principalmente.

El óxido de etileno es un compuesto cíclico de éter con un peso molecular de 44.05; congela a  $-111.3^{\circ}$ , hierve a  $10.73^{\circ}$  a presión atmosférica. Está formado por dos átomos de carbono unidos a un oxígeno, formando un anillo de tres miembros, muy reactivo. Su estructura es la siguiente: (6)



Al estado puro el óxido de etileno es muy peligroso de manejar porque la mezcla con el aire a partir de 3% es explosiva. Reacciona rápidamente al entrar en contacto con la humedad y algunos catalizadores como óxidos de hierro, estaño y aluminio; es completamente soluble en agua a  $10^{\circ}$  y en presencia de un catalizador ácido o básico reacciona con agua para formar glicoles de polietileno. Es además, soluble en alcohol, éter y algunos solventes orgánicos, así como en materiales sólidos como hule, cuero y plástico.

Las inhalaciones a bajas concentraciones durante un período largo provocan náuseas, vómito y dolor de ca

beza. El óxido de etileno evapora rápidamente de la piel produciendo sólo enfriamiento, pero un contacto prolongado produce notable irritación cutánea. (7)

Las inhalaciones a concentraciones considerables causan irritación de los ojos, y de las vías pulmonares. La máxima concentración permitida en 100 ppm; 300 ppm son toleradas por un máximo de 60 minutos; 50,000 a 100,000 ppm son fatales en pocos minutos. (8)

El óxido de etileno se produce industrialmente por la dehidrocloración de la clorhidrina etilénica. (9)

Algunas teorías han sido propuestas sobre la forma - en que el óxido de etileno destruye a los microorganismos. La teoría más comunmente expresada se basa en el proceso de alquilación; el reemplazo de un radical hidroxietil de un átomo de hidrogeno libre dentro de un grupo químico tal como sulfhidrilo, amino, carboxilo o hidroxilo de la molécula de proteína(10). No se ha definido cual de estos grupos es atacado -- primero por el óxido de etileno, pero se cree que el grupo sulfhidrilo es el más reactivo o susceptible - al gas.

El grado en el cual la destrucción de los microorganismos ocurre, se relaciona al grado de difusión del óxido de etileno a través de la pared de la célula y la disponibilidad o accesibilidad de uno de los grupos químicos para reaccionar con el óxido de etileno. El grado de destrucción depende también de que la célula esté en grado vegetativo o de espora (11). Se cree que en la formación de la espora bacteriana el grupo sulfhirilo puede estar protegido por cambios en la molécula de proteína y la acción esterilizante del óxido de etileno estará restringido a uno u otro grupo que no es tan reactivo.

Si el proceso de alquilación es aceptado como la forma de acción, la destrucción de los microorganismos por el óxido de etileno es una interferencia química y probablemente, esté cercanamente relacionada con la inactivación del proceso reproductivo de la célula. (12)

Se ha encontrado que para esterilizar materiales se puede emplear polietileno para envolverlos si tiene un espesor de 254 a 762 micras ya que en estas condi



ciones es completamente permeable al óxido de etileno. (13)

Algunos de los microorganismos que se encuentran en el aire y podrían contaminar cualquier producto son:

Bacillus subtilis.— Bacilos de 3 a 4 micras x 1 micra, rectos o curvos, de extremos redondeados, aislados o en cadenas. Las esporas son ovales de 1.2 x 0.6 micras dispuestas en forma ecuatorial o subterminal que germina lateralmente. Es gram-positivo y no acidorresistente.

Hábitat.— Heno, polvo, leche, suelo, agua y aire.

(14)

Staphylococcus aureus.— Es una esfera típica, si bien puede estar aplanada en un sector cuando las células se agrupan en racimos irregulares. El diámetro medio es de 0.8 micras. Su temperatura óptica de desarrollo es 35° es anaerobio facultativo y grampositivo.

Hábitat.— Se lleva en la piel, en el conducto intestinal y especialmente en la mucosa de la nasofarin-

ge. Estos organismos se expulsan en gotitas con la tos y el estornudo y aún por la conversación ordinaria. (15)

Sarcina lutea.- Cocos grampositivos más grandes que los estafilococos, con diámetro medio de 1 a 1.5 micras. La división celular se produce en tres planos, dando lugar a la formación de paquetes cúbicos de los organismos. El desarrollo óptimo ocurre a 25°. Es aerobio.

Hábitat.- Está en el aire, agua o piel humana. (15)

**PLAN DE TRABAJO**

Para poder demostrar si un microorganismo queda protegido de la acción esterilizante del óxido de etileno por estar ocluido dentro de un cristal, o bien, dentro de un acúmulo de cristales se seguirán los - pasos siguientes:

1o. Tratar de obtener este tipo de cristales a partir de una solución concentrada de la substancia en el solvente adecuado a la que se adicionará en el momento de -- cristalizar una suspensión concentrada de microorganismos.

2o. Se someterán esos cristales a la acción del óxido de etileno.

3o. Se probará la esterilidad de los cristales tratados con óxido de etileno en comparación de los no tratados con dicho - gas de acuerdo a los tres procedimientos siguientes:

A) Disolver los cristales sin tratar con

óxido de etileno y sembrar de esta solución.

B) Sembrar directamente los cristales tratados con óxido de etileno, para probar si la contaminación no es superficial.

C) Disolver los cristales tratados con óxido de etileno y sembrar de la solución.

De acuerdo a lo anterior habrá cinco posibilidades a encontrar:

	Proceso a	Proceso b	Proceso c
1a. Posibilidad	-	-	-
2a. Posibilidad	+	-	-
3a. Posibilidad	+	-	+
4a. Posibilidad	+	+	-
5a. Posibilidad	+	+	+

(El signo - indica que el producto esta estéril y el signo + que esta contaminado)

De lo que se podrá deducir:

1a. Posibilidad.- El solvente o la substancia tienen acción sobre los microorganismos.

2a. Posibilidad.- El óxido de etileno si esterilizó la muestra.

3a. Posibilidad.- Es posible que los microorganismos estén ocluidos en los cristales.

4a. y 5a. Posibilidad.- La esterilización con óxido de etileno en las condiciones de trabajo no es ideal para la esterilización de cristales.

Se estudiarán por separado las substancias solubles y las insolubles en agua.

En el caso de las substancias solubles en agua es interesante hacer notar que no se puede llegar a la conclusión de si la contaminación está en la superficie del cristal o incluida, ya que los cristales se disolverán al agregarlos al medio de cultivo. Solo se llega a la conclusión de que después de la esterilización con óxido de etileno, se obtiene un -

producto estéril o contaminado.

En el caso de las sustancias insolubles en agua, - también serán insolubles en los medios de cultivo empleados normalmente en las pruebas de esterilidad; así, suspendiendo directamente los cristales en el medio de cultivo se sabrá si hay contaminación superficial. Para apreciar si hay contaminación incluida en los cristales es necesario disolverlos en solventes orgánicos, que no tengan acción sobre los microorganismos, para permitir el desarrollo en el medio de cultivo. Por esta razón y porque las sustancias a probar se obtienen en el seno de soluciones de solventes orgánicos, se hace necesario un estudio de la acción de algunos de los solventes orgánicos como son el metanol, etanol, acetona y dioxano sobre los microorganismos de prueba.

El trabajo experimental se dividirá en tres partes:

---

1a. Parte.- Consistirá en pruebas con sustancias solubles en agua.

2a. Parte.- Se probará la acción de algunos solventes orgánicos sobre los microorganismos de prueba.

3a. Parte.- Pruebas con sustancias insolubles en agua, principalmente esteroides.



MATERIAL Y

SUBSTANCIAS

UTILIZADAS

Microorganismos de Prueba.

Se usaron cepas de la American Type Culture Collection (16).

Bacillus subtilis (esporas) ATCC 6633; empleado normalmente en la preparación de testigos para la esterilización con óxido de etileno.

Sarcina lutea ATCC 9341

Staphylococcus aureus ATCC 6538P

Los microorganismos se encontraban en suspensión en solución reguladora de fosfatos adicionada al 15% de glicerol, según la técnica de Tanguay. (17)

Estos microorganismos se escogieron porque se encuentran en el aire y en el momento de cristalizar una sustancia podrían contaminar la solución.

Substancias utilizadas:

**Substancias solubles en agua:**

Sacarosa,  
Sulfato de estreptomicina,  
Manitol y  
Ascorbato de sodio.

**Substancias insolubles en agua:**

Estradiol,  
Benzoato de estradiol,  
Hexahidrobenczoato de estradiol,  
Acetato de hidrocortisona,  
Prednisona,  
Acetato de prednisolona,  
Etinil estradiol y  
Acetato de desoxicorticosterona.

**Solventes utilizados:**

Se emplearon los siguientes solventes: agua, metanol,  
etanol, acetona y dioxano estériles.

El agua se esterilizó en autoclave y los solventes

organicos por medio de Filtración Seitz utilizando filtros EKS No. 4.

Medios utilizados.

a) Medio líquido de Tioglicolato. Se utilizó Bacto Fluid Thioglycollate medium (B256-01) que es un medio deshidratado que corresponde en composición al Medio Optativo de tioglicolato de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. (18, 19)

b) Medio líquido de Sabouraud. Se empleó Bacto Sabouraud Dextrose Broth (B0382-01) que es un medio deshidratado que una vez preparado corresponde al Medio Líquido de Sabouraud de la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. (18, 19)

Se escogieron estos medios porque son los que señala la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos para pruebas de esterilidad de soluciones y suspensiones y porque en el Medio Líquido de Tioglicolato desarrollan bien los microorganismos de prueba. El medio líquido de Sabouraud se usó para segu-

ridad, es decir, para comprobar que no había contaminaciones extrañas.

Si se obtenía desarrollo en algún tubo, se comprobaba que el desarrollo fuera sólo del microorganismo de prueba y si se encontraba contaminación adicional se desechaban esos resultados.

#### Técnica de cristalización.

Teniendo en cuenta que para obtener resultados válidos y reproducibles es necesario seguir siempre una misma técnica de cristalización, todas se hicieron preparando una solución concentrada en caliente de la substancia en el solvente adecuado y vaciando sobre un recipiente enfriado exteriormente con hielo en el que previamente se había colocado una suspensión de microorganismos. La agitación se continuó hasta franca cristalización; una vez terminada ésta se procedió inmediatamente a la filtración al vacío en condiciones asépticas para evitar contaminaciones extrañas.

#### Técnica de esterilización.

En una bolsa de polietileno de espesor permeable al óxido de etileno (635 micras) se colocaron en cada uno de los casos aproximadamente 200 mg de la sustancia distribuida en tal forma que quedara una capa delgada a la que tuviera perfecto acceso el óxido de etileno.

Se utilizó para esterilizar el aparato "American" - 20 x 20 x 36 Cryotherm Sterilizer, empleando una mezcla de óxido de etileno 12% y bióxido de carbono - 88%, dejándolo actuar durante 4 horas a 1.26 Kg/cm<sup>2</sup> y a 54°.

#### Pruebas de esterilidad.

a) Referente a las pruebas de esterilidad de las - sustancias solubles en agua, tanto para los cristales sin tratar con óxido de etileno como para los tratados.

Aproximadamente 200mg se vaciaron íntegramente en un tubo estéril y se disolvieron en 25ml de solución salina isotónica estéril. En condiciones estériles se procedió a hacer la filtración al vacío utilizando

do membrana millipore HA 0.45u con poros de 0.45  $\mu$ cras, sembrando el centro de la misma en 80 ml de medio líquido de Tioglicolato, incubando a 37° y leyendo el resultado a los 7 días. La parte exterior de la membrana se sembró en medio líquido de Sabouraud, incubando a 23° durante 10 días.

b) Referente a las pruebas de esterilidad de las sustancias insolubles en agua tanto para los cristales sin tratar con óxido de etileno como para los tratados.

Aproximadamente 200 mg. de la sustancia se vaciaron en un tubo estéril y se disolvieron en 5 ml de dioxano estéril. Una vez lograda la disolución completa ayudada por agitación manual, se tomó 1 ml y se sembró en 40 ml de medio líquido de tioglicolato, resemebrándose a las 48 horas, leyendo el resultado a las 48 horas después de la resiembra. Se incubaron a 37°.

---

Para las sustancias insolubles en agua se llevó a cabo una prueba adicional que consiste en sembrar directamente en el medio de cultivo de los cristales

les tratados con óxido de etileno. El contenido de cada una de las bolsas se vació en 40 ml de medio líquido de tioglicolato, resemebrando a las 48 horas, leyendo el resultado a los 7 días después de la resiembra. Se incubaron a 37°.



TRABAJO EXPERIMENTAL

la. Parte.- Las cristalizaciones de las sustancias solubles en agua se llevaron a cabo de acuerdo a la siguiente técnica: 0.5 g de la sustancia se disolvieron en la menor cantidad de agua aproximadamente 1 ml. La solución se vació en un recipiente enfriado exteriormente con hielo en el que previamente se habían colocado 0.2 ml de la suspensión de microorganismos. Se procedió a agitar hasta franca cristalización y una vez terminada ésta, se filtró al vacío usando material estéril y condiciones de trabajo asepticas para evitar contaminaciones extrañas.

a) Las primeras cristalizaciones se hicieron con las siguientes sustancias y contaminantes:

<u>Substancia</u>	<u>Contaminante</u>
Manitol	<u>Bacillus subtilis</u> (esporas)
Manitol	<u>Staphylococcus aureus</u>
Manitol	<u>Sarcina lutea</u>
Sacarosa	<u>Bacillus subtilis</u> (esporas)
Sacarosa	<u>Staphylococcus aureus</u>
Sacarosa	<u>Sarcina lutea</u>

Ascorbato de sodio	<u>Bacillus subtilis</u> (esporas)
Ascorbato de sodio	<u>Staphylococcus aureus</u>
Ascorbato de sodio	<u>Sarcina lutea</u>
Sulfato de	
Estreptomina	<u>Staphylococcus aureus</u>

Los resultados de las pruebas de esterilidad de describen en la Tabla 1. Se menciona como procedimiento uno el resultado de la prueba de esterilidad de los cristales tratados con el gas esterilizante. El signo - indica que no hubo desarrollo en los medios de cultivo, es decir, que el producto estaba estéril y el signo + que si hubo desarrollo, o sea, que el producto estaba contaminado.

b) Se cristalizaron 18 lotes de manitol contaminados con Bacillus subtilis; los resultados de las pruebas de esterilidad se muestran en la Tabla 2.

c) Se cristalizaron 18 lotes de manitol contaminados con Staphylococcus aureus; los resultados de las pruebas de esterilidad se muestran en la Tabla 2.

d) Se cristalizaron 18 lotes de manitol contaminado con Sarcina lutea; los resultados se muestran en la Tabla 2.

e) Se cristalizaron 18 lotes de manitol en el medio ambiente, o sea, que se excluyó la contaminación artificial y toda precaución de asepsia ya que el material con el que se trabajó no se encontraba estéril; los resultados se muestran en la Tabla 2.

f) Se hicieron tres cristalizaciones de manitol contaminado con Bacillus subtilis; se utilizaron 5 gramos de manitol para cada una y 2 ml de la suspensión de microorganismos. Los cristales de cada una de las cristalizaciones se dividió en 11 porciones, con una de las cuales se efectuó la prueba de esterilidad sin tratar con óxido de etileno y las otras 10 se trataron en bolsas separadas con dicho gas, los resultados se muestran en la Tabla 3. Esta prueba se llevó a cabo para ver la reproducibilidad de los resultados.

---

2a. Parte.- Para poder aplicar la teoría de las sustancias insolubles en agua, es necesario hacer un

estudio previo de la acción de los solventes sobre los microorganismos por dos razones:

- a) Porque estas sustancias se recristalizan en solventes orgánicos y si tienen una acción determinante sobre los microorganismos no se podrá extender la teoría a esas sustancias.
- b) Porque para poder detectar un tipo de contaminación oculta en el cristal, es necesario su disolución en solventes orgánicos y si éstos tienen una acción marcada, no permitirán la detección de la contaminación.

Así pues, se escogieron algunos solventes utilizados en la cristalización de esteroides como son metanol, etanol, acetona y dioxano, procediendo de acuerdo a la siguiente técnica:

En un tubo estéril se colocaron 10 ml del solvente esterilizado por filtración Seitz; se agregó 0.4 ml de la suspensión de microorganismos y cada hora se tomó 1 ml para sembrarlo en 80 ml de medio líquido

de tioglicolato. El estudio se extendió por 7 horas. Los medios incubaron a 37° durante 7 días. Los resultados se encuentran en la Tabla 4.

3a. Parte.- Se cristalizó cada una de las sustancias de los cuatro solventes escogidos, contaminando en cada caso con Bacillus subtilis y con Sarcina lutea. La técnica utilizada para cristalizar las sustancias es la utilizada en las sustancias solubles en agua, empleando en cada caso 4 g de la sustancia y 1 ml de la suspensión de microorganismos, dividiendo los cristales en 9 porciones.

Las pruebas de esterilidad se llevaron a cabo de acuerdo a 3 procedimientos:

Procedimiento 1.- Disolución de los cristales sin tratar con óxido de etileno, en 5 ml de dioxano estéril y siembra de 1 ml. en 40 ml de medio líquido de tioglicolato, resemebrando a las 48 horas, leyendo el resultado a los 7 días.

Procedimiento 2.- Siembra directa de 4 porciones de

Los cristales tratados con óxido de etileno en 40ml de medio líquido de tioglicolato; resiembra a las 48 horas.

Procedimiento 3.- Disolución de cada una de las otras cuatro porciones en 5 ml de dioxano; siembra de 1 ml de la solución en 40 ml de medio líquido de tioglicolato; resiembra a las 48 horas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

TABLE 1

SUBSTANCIA	CONTAMINANTE	CRISTALIZADO EN:	DISUELTO EN: (PRUEBA DE ESTERILIDAD)	PROC. 1	PROC. 2
Acorbato de sodio	<i>Bacillus subtilis</i>	Agua	Sol. colim. isotónica	-	-
" " "	<i>Staphylococcus aureus</i>	"	" " "	-	-
" " "	<i>Sarcina lutea</i>	"	" " "	-	-
Manitol	<i>Bacillus subtilis</i>	"	" " "	+	+
"	<i>Staphylococcus aureus</i>	"	" " "	+	+
"	<i>Sarcina lutea</i>	"	" " "	+	-
Sacarosa	<i>Bacillus subtilis</i>	"	" " "	-	-
"	<i>Staphylococcus aureus</i>	"	" " "	-	-
"	<i>Sarcina lutea</i>	"	" " "	+	-
Sulfato de Estreptomicina	<i>Staphylococcus aureus</i>	"	" " "	+	-



TABLE 2

SUBSTANCIA	CONTAMINANTE	No. DE PRUEBAS EFECTUADAS	CRISTALICIDAD EN:	DISURTO EN: (FORMA DE ESTERILIZACION)	PROC. 1		PROC. 2		LÍMITES DEL TAMAÑO PROMEDIO DE LOS CRISTALES
					+	-	+	-	
Manífol	<i>Bacillus subtilis</i>	18	Agua	Sol. satino. isotonico.	18	0	15	3	25-56 $\mu$
"	<i>Staphylococcus aureus</i>	18	"	" " "	18	0	18	0	28-56 $\mu$
"	<i>Sarcina lutea</i>	18	"	" " "	18	0	9	9	30-70 $\mu$
"	Medio ambiente	18	"	" " "	9	9	0	18	30-70 $\mu$

TABLA 3

SUBSTANCIA	CONTAMINANTE	CRISTALIZADO EN:	DISUELTO EN: (PRUEBA DE ESTABILIDAD)	PROC. L	PROCEDIMIENTO	
					+	-
Manitol	<i>Bacillus subtilis</i>	Agua.	Sol. salina isotónica	+	5	5
"	" "	"	" " "	+	4	6
"	" "	"	" " "	+	4	6

TABLE 4

CONTAMINANTE	SOLVENTE	PRUEBAS REPECTIVAS	TIEMPO EN HORAS						
			1	2	3	4	5	6	7
<i>Bacillus subtilis</i>	Metanol	2	+	+	+	+	+	+	+
"	Etolol	2	+	+	+	+	+	+	-
"	Acetona	2	+	+	+	+	+	+	+
"	Dioxano	2	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	Metanol	2	-	-	-	-	-	-	-
"	Etolol	2	-	-	-	-	-	-	-
"	Acetona	2	-	-	-	-	-	-	-
"	Dioxano	2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sarcina lutea</i>	Metanol	2	+	+	+	+	+	+	+
"	Etolol	2	+	+	+	+	+	+	+
"	Acetona	2	+	+	+	+	+	+	+
"	Dioxano	2	+	+	+	+	+	+	+

TABLE 5

SUBSTANCIA	CONTAMINANTE	No. DE PRUEBAS EFECTUADAS	CRISTALIZADO (H)	DISUELTO EN (PRUEBA DE ESTERILIDAD)	PROC. 1	PROCEDIMIENTO 2			PROCEDIMIENTO 3	
						No. DE PRUEBAS	+	-	No. DE PRUEBAS	+
Benceno de estradiol	Sediment sublimé	9	Metanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Etanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Acetona	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Dioxano	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	Serum luteo	9	Metanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Etanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Acetona	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Dioxano	Dioxano	-	4	0	4	4	0
Acetato de desoxiacetona	Sediment sublimé	9	Metanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Etanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Acetona	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Dioxano	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	Serum luteo	9	Metanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Etanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Acetona	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Dioxano	Dioxano	-	4	0	4	4	0
Acetato de progesterona	Sediment sublimé	9	Metanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Etanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Acetona	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Dioxano	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	Serum luteo	9	Metanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Etanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Acetona	Dioxano	-	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Dioxano	Dioxano	-	4	0	4	4	0
Acetato de hidrocortisona	Sediment sublimé	9	Metanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Etanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Acetona	Dioxano	+	4	0	4	4	0
" " "	" " "	9	Dioxano	Dioxano	+	4	0	4	4	0

TABLE 6 (cont.)

SUBSTANCIA	CONTAMINANTE	No. DE PRUEBAS EFECTUADAS	CRISTALIZADO EN:	DISUELTO EN: (PRUEBA DE ESTERILIDAD)	PROC. 1	PROCESIMIENTOS 2			PROCESIMIENTOS		
						No. DE PRUEBAS	+	-	No. DE PRUEBAS	+	-
Rectate de hidrocoftisona	Serum. luteo.	9	Metanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Etolol	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Acetona	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Dioxano	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
Progesterona	Basilio subtilis	9	Metanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0	4
" "	" "	9	Etolol	Dioxano	+	4	0	4	4	0	4
" "	" "	9	Acetona	Dioxano	+	4	0	4	4	0	3
" "	" "	9	Dioxano	Dioxano	+	4	0	4	4	1	3
" "	Serum. luteo.	9	Metanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" "	" "	9	Etolol	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" "	" "	9	Acetona	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" "	" "	9	Dioxano	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
Hexilresorcinato de estradiol	Basillus subtilis	9	Metanol	Dioxano	+	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Etolol	Dioxano	+	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Acetona	Dioxano	+	4	0	4	4	3	4
" " "	" "	9	Dioxano	Dioxano	+	4	0	4	4	0	4
" " "	Serum. luteo.	9	Metanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Etolol	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Acetona	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" " "	" "	9	Dioxano	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
Progesterona	Basillus subtilis	9	Metanol	Dioxano	+	4	0	4	4	1	3
" "	" "	9	Etolol	Dioxano	+	4	0	4	4	1	3
" "	" "	9	Acetona	Dioxano	+	4	1	3	4	0	4
" "	" "	9	Dioxano	Dioxano	+	4	0	4	4	0	4
" "	Serum. luteo.	9	Metanol	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" "	" "	9	Etolol	Dioxano	+	4	1	3	4	0	4
" "	" "	9	Acetona	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4
" "	" "	9	Dioxano	Dioxano	-	4	0	4	4	0	4

RESULTADOS

1a. Parte

Tabla 1.- Los cristales de ascorbato de sodio contaminados con Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus y Sarcina lutea, no mostraron contaminación ni aún antes del tratamiento con óxido de etileno.

Los cristales de manitol contaminados con Bacillus subtilis y con Staphylococcus aureus, resultaron contaminados antes y después del tratamiento con el gas esterilizante. Los cristales del manitol contaminados con Sarcina lutea estaban contaminados antes de tratarlos con óxido de etileno, pero después del tratamiento resultaron estériles.

Los cristales de sacarosa contaminados con Bacillus subtilis y con Staphylococcus aureus no presentaron contaminación ni antes ni después del tratamiento con el óxido de etileno. Los cristales de sacarosa contaminados con Sarcina lutea estaban contaminados antes del tratamiento con óxido de etileno, pero después se encontraron estériles.

Los cristales de sulfato de estreptomycinina contaminados con Bacillus subtilis, mostraron contaminación

antes del tratamiento con óxido de etileno, y después del tratamiento se encontraron estériles.

Tabla 2.- Los 18 lotes de manitol cristalizados - contaminados con Bacillus subtilis, mostraron contaminación antes del tratamiento con óxido de etileno y después de dicho tratamiento la contaminación persistió en 15 de los casos.

Los cristales de manitol contaminados con Staphylococcus aureus, mostraron contaminación en todos los casos antes y después del tratamiento con el gas esterilizante.

De los cristales de manitol contaminados con Sarcina lutea, los 18 lotes mostraron contaminación antes del tratamiento con óxido de etileno y después del tratamiento la contaminación persistió en 9 lotes.

Al cristalizar 18 lotes de manitol en el medio ambiente sólo 9 lotes mostraron contaminación antes del tratamiento con óxido de etileno y después en ninguno de los casos apareció contaminación.



Tabla 3.- Los cristales del primer lote de manitol contaminados con Bacillus subtilis, antes de tratar con óxido de etileno estaban contaminados y la contaminación persistió en 5 de las 10 porciones que si se trataron con dicho gas.

Los cristales del segundo lote de manitol mostraron contaminación antes de tratar con óxido de etileno y persistió en 4 de las 10 porciones que se trataron con el gas esterilizante.

El tercer lote de manitol dió contaminado antes de tratar con óxido de etileno y la contaminación persistió en 4 de las 10 porciones tratadas.

#### 2a. Parte

Tabla 4.- Al tratar la suspensión de Bacillus subtilis con los cuatro solventes, tomando una muestra cada hora durante 7 horas se puede observar que en ese lapso hubo desarrollo en todos los tubos excepto en el del etanol a las 7 horas.

Al tratar la suspensión de Staphylococcus aureus, "

con los cuatro solventes, en ningún caso se observó desarrollo.

Al tratar la suspensión de Sarcina lutea, con los cuatro solventes durante 24 horas se observó que al cabo de este tiempo se produjo desarrollo en el medio de cultivo.

### 3a. Parte

Tabla 5.- Los cristales de benzoato de estradiol - contaminados con Bacillus subtilis, obtenidos en los cuatro solventes, mostraron contaminación antes del tratamiento con óxido de etileno, pero después del tratamiento resultaron estériles tanto en la superficie como en el interior.

Los cristales de benzoato de estradiol contaminados con Sarcina lutea, obtenidos en los cuatro solventes no mostraron contaminación antes ni después del tratamiento con el gas esterilizante.

Los cristales de acetato de desoxicorticosterona -- contaminados con Bacillus subtilis, obtenidos en -

los cuatro solventes, resultaron contaminados antes de tratar con óxido de etileno. Después del tratamiento no se observó contaminación superficial en ningún caso; por disolución de los cristales se presentó contaminación de un caso de los cristales obtenidos en dioxano.

Los cristales de acetato de desóxicorticosterona - contaminados con Sarcina lutea, obtenidos en los cuatro solventes, no mostraron contaminación antes ni después del tratamiento con el gas esterilizante.

Los cristales de acetato de prednisolona contaminados con Bacillus subtilis, obtenidos en los cuatro solventes resultaron contaminados antes del tratamiento con óxido de etileno. Después del tratamiento no se presentó contaminación superficial en ningún caso; por disolución de los cristales se presentó contaminación en un caso de los cristales obtenidos en acetona.

Los cristales de acetato de prednisolona contamina-

dos con Sarcina lutea, obtenidos en metanol, acetona y dioxano, no mostraron contaminación antes de tratar con óxido de etileno, pero sí los obtenidos en etano. Después del tratamiento no se observó contaminación en ningún caso.

Los cristales de acetato de hidrocortisona contaminados con Bacillus subtilis, obtenidos en los cuatro solventes resultaron contaminados antes de tratar con óxido de etileno. Después del tratamiento con el gas no se presentó contaminación superficial, pero al disolver los cristales obtenidos en etanol, se observó contaminación en un caso.

Los cristales de hidrocortisona contaminados con Sarcina lutea, obtenidos en los cuatro solventes no mostraron contaminación antes ni después del tratamiento con óxido de etileno.

Los cristales de Progesterona contaminados con Bacillus subtilis, obtenidos en los cuatro solventes mostraron contaminación antes del tratamiento con óxido de etileno. Después del tratamiento, no se pre

sentó contaminación superficial y por disolución de los cristales se observó contaminación en un caso - de los obtenidos en acetona y en un caso de los obtenidos en dioxano.

Los cristales de progesterona contaminados con Sarcina lutea, obtenidos en los cuatro solventes no mostraron contaminación antes ni después del tratamiento con óxido de etileno.

Los cristales de hexahidrobenzoato de estradiol contaminados con Bacillus subtilis, obtenidos en los cuatro solventes resultaron contaminados antes del tratamiento con óxido de etileno. Después del tratamiento con dicho gas no se observó contaminación superficial en ningún caso; por disolución de los cristales resultaron contaminados tres casos de los cristalizados en acetona.

Los cristales de hexahidrobenzoato de estradiol contaminados en Sarcina lutea, obtenidos en los cuatro solventes no mostraron contaminación antes ni después del tratamiento con óxido de etileno.

Los cristales de prednisona contaminados con Bacillus subtilis, obtenidos en los cuatro solventes mostraron contaminación antes del tratamiento con óxido de etileno. Después del tratamiento se observó contaminación superficial en un caso de los cristales obtenidos en acetona; por disolución de los cristales se observó contaminación en un caso de los obtenidos en metanol y en un caso de los obtenidos en etanol.

Los cristales de prednisona contaminados con Sarcina lutea, obtenidos en metanol, acetona y dioxano no mostraron contaminación antes del tratamiento con el gas esterilizante, sólo se observó en un caso contaminación superficial de los obtenidos en etanol. Por disolución de los cristales no se observó contaminación en ningún caso.

CONCLUSIONES

1. En el caso de las sustancias solubles en agua solo se obtuvieron cristales contaminados con esporas de Bacillus subtilis de manitol; con Staphylococcus aureus de manitol y de sulfato de estreptomycin; con Sarcina lutea de manitol y sacarosa.
2. Al tratar suspensiones de microorganismos con metanol, etanol, acetona y dioxano, en las condiciones del experimento, estos solventes mostraron acción bactericida solo sobre Staphylococcus aureus, no ejerciéndola sobre Bacillus subtilis ni sobre Sarcina lutea, aunque el contacto duró 6 h.
3. En el caso de las sustancias insolubles en agua no se obtuvieron cristales contaminados con Sarcina lutea de benzoato de estradiol, acetato de desoxicorticosterona, acetato de hidrocortisona, progesterona y hexahidrobencato de estradiol. En unos casos si fue posible lograr la contaminación al cristalizar prednisona y acetato de prednisolona.



Se obtuvieron cristales contaminados con esporas de Bacillus subtilis de benzoato de estradiol, acetato de desoxicorticosterona, acetato de prednisolona, acetato de hidrocortisona, progesterona, hexahidrobenzoato de estradiol y prednisona.

4. El tamaño de los cristales de las sustancias solubles en agua utilizadas, no tiene relación aparente con la contaminación que presentan. La forma de los cristales de las sustancias insolubles en agua utilizadas, probablemente este relacionada con la contaminación obtenida.

5. En el caso de las sustancias solubles en agua, después de la esterilización con óxido de etileno en las condiciones de trabajo, se obtuvieron 55 lotes estériles y 57 contaminados. En el caso de las sustancias insolubles en agua, presentaron contaminación superficial 2 de 224 casos; presentaron contaminación aparente incluida 10 de 224 casos.

---

6. La técnica diseñada, para la comprobación de la esterilización de cristales insolubles en agua, es efectiva (pag. 27-b)

7. En algunos casos, para obtener esterilización efectiva con óxido de etileno, es necesario - cambiar las condiciones de trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cotton, R. T. and R. C. Roark  
Ethylene oxide as a fumigant  
Industrial and Engineering Chemistry, 20: 805,  
August 1928
2. Phillips G. R. and S. Kaye  
Sterilizing action of gaseous ethylene oxide  
I Review, American Journal of Hygiene, 50: 270-279,  
November 1949
3. Lloyd R. S. and L. Thompson  
Gaseous Sterilization with ethylene oxide  
Folleto publicado por la "American Sterilizer Co."
4. Lazarus J., P. C. Eisman and D. Jaconia  
Liquid Ethylene oxide sterilization and other  
Pharmaceutical aspects of a novel dosage form
5. Sheehan R. A., J. H. King and S. Kaye  
Ethylene oxide sterilization in ophthalmology  
American Journal Of Ophthalmology 42: 424-429,  
December 1956
6. Wheland G. W.  
Advanced Organic Chemistry, Third Edition  
John Wiley & Sons, Inc. New York, 1960, pag. 38-41
7. Synek J.  
Fossibilita pratiche dell ossido di etilene quale  
agente sterilizzante  
Bolletino chimico Farmaceutico 11: 700-803 Novembre 1964

8. The Merck Index  
Seventh, edition  
Merck & Co. Inc. New York, 1960 pag 429.
9. Vogel, A. I.  
Practical Organic Chemistry,  
Third edition  
Longmans, London 1961, pag. 444
10. Fraenkel - Conrat, H. I.  
Action of 1-2-epoxides on proteins  
Journal Biological Chemistry, 154: 227-238, 1949
11. Phillips R.  
The Sterilizing action of gaseous ethylene oxide  
II.- Sterilization of contaminated objects with  
ethylene oxide and related compounds.  
The American Journal of Hygiene 50: 280-287, 1949
12. Domínguez, H. A.  
Esterilización por óxido de etileno  
Publicación de la Asociación farmacéutica Mexicana  
1: 37-42, 1966
13. Fernández Oscar  
AMSCO Operating Manual  
American Sterilizing Company, Texas.
14. Topley W. W. C. y G. S. Wilson  
Bacteriología e Inmunidad  
Editora Nacional, Segunda Edición, 1946, pag. 651-652

15. Smith y Conant.  
Bacteriología de Zinsser  
Union Tipográfica Editorial Hispano Mexicana,  
2a. ed. México 1964. pag. 280 y 294
16. American Type Culture Collection  
Catalog of Cultures, sixth edition, 1958  
pags. 11,60 y 65.
17. Tanguay A. E.  
Preservation of microbiological Assay Organisms  
by direct Freezing Appl. Microbiol. 7,84-88 1959
18. Difco Manual  
Nineth Edition  
Difco Laboratories Inc.  
Michigan, 1965 pags. 195-196 y 200
19. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos  
Tercera Edición, México 1962, pags. 752-754
20. Micro Chemical and Instrumental Analysis  
Millipore Filter Corporation, U.S.A. 1963 pag. 7