

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**DETERMINACION DE LOS NIVELES MICROBIOLOGICOS EN FORMAS FARMACEUTICAS NO ESTERILES.**

**TESIS PROFESIONAL**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
ORIENTACION FARMACIA  
P R E S E N T A**

**ALEJANDRO ANTONIO RAMIREZ NEGRETE**

**1 9 7 9**

**16776**



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.

## I N D I C E

INTRODUCCION	- - - - -	10
OBJETIVO	- - - - -	13
PARTE EXPERIMENTAL	- - - - -	14
DISCUSION	- - - - -	38
CONCLUSIONES	- - - - -	45
BIBLIOGRAFIA	- - - - -	47

## INTRODUCCION

Dentro de la industria farmacéutica el mejoramiento constante de la calidad de los medicamentos debe ser una preocupación primordial, ya que con el uso de la mayoría de éstos se pone en juego la salud del paciente. Es por este hecho que desde la aparición de los productos de patente, en el mercado, fueron incrementadas las investigaciones hacia factores que elevaran la calidad del producto, tales como mayor biodisponibilidad, estabilidad química y física adecuada, eliminación de efectos colaterales, mayor asepsia en el proceso de fabricación, mejor presentación, etc., con el fin de ofrecer al consumidor un producto con amplias ventajas sobre los demás.

Como una consecuencia de lo anterior, el control microbiológico de formas farmacéuticas no estériles ha sido considerado, en los últimos años, como un factor de gran importancia en la calidad de los mismos, ya que la presencia de microorganismos contaminantes puede dar origen a cambios físicos y químicos del producto como: cambio en la coloración, deshidratación del producto, alteraciones en el sabor, etc., y a la vez puede presentarse la degradación e inhibición del principio activo, con lo que el uso de productos farmacéuticos contaminados puede representar una terapia inútil, y además llegar a ser un riesgo serio para el paciente.

Así en breve revisión de los artículos relacionados al tema vemos que en 1955 Vaghan<sup>1</sup> considera que las infecciones por P. aeruginosas son más frecuentes que las reportadas en la literatura, y que estas pudieron ser originadas por productos oftálmicos contaminados.

Durante la década de los años 60's, la FDA efectuó aislamientos frecuentes de *P. aeruginosas* de productos oftálmicos.<sup>2</sup>

En Suecia durante 1964 un unguento oftálmico es involucrado como el responsable de severas infecciones oculares producidas -- por *P. aeruginosas*.<sup>3</sup> Durante este mismo año la FDA con motivo de los problemas que la contaminación ha ocasionado, establece que todo producto que de alguna manera tenga contacto con los ojos debe ser estéril.<sup>4</sup>

A pesar de todo esto en Inglaterra al año siguiente, 1966, es publicado un reporte sobre una epidemia intrahospitalaria, de pacientes infectados después de operaciones oculares, siendo -- *P. aeruginosas* el microorganismo causante de éstas.<sup>5</sup>

Durante 1966 Kallings y colaboradores hicieron estudios generales sobre la contaminación microbiológica de formas farmacéuticas no estériles, encontrando un elevado número de microorganismos coliformes, principalmente en productos que contienen sustancias de origen vegetal o animal.<sup>3</sup> En este mismo año se presentaron en Suecia 202 casos de salmonelosis, causada por la ingestión de tabletas contaminadas, siendo las cuentas totales de estas tabletas, millones de gérmenes por gramo con predominio de microorganismos coliformes.<sup>3</sup> Durante este mismo año se presentaron epidemias hospitalarias en Massachusetts, Oregon, Ohio, California e Inglaterra causadas por la administración de cápsulas de rojo carmín infestadas con *Salmonella cubana*.<sup>6</sup>

De mayo de 1966 a julio de 1966 la FDA hizo 113 aislamientos del género *Salmonella* en productos farmacéuticos no estériles y materias primas de origen animal principalmente.<sup>9</sup>

Tomando en consideración todo lo anterior se deriva la necesidad de llevar a cabo un control microbiológico estricto de este tipo de formulaciones no estériles, lo cual pone de manifiesto la necesidad de contar con las técnicas más adecuadas para la detección, cuantificación e identificación de los microorganismos con taminantes de estas formas.

Como consecuencia de la aparición en la literatura de estos acontecimientos algunos investigadores europeos como, Dony (1968) y Kallings (1971), así como la Organización Mundial de la Salud sugirieran el establecimiento de límites en la determinación del número total de microorganismos viables presentes, con la finalidad de mejorar la calidad, desde el punto de vista microbiológico de formas farmacéuticas no estériles.

De esta misma forma el "Comité Ejecutivo para la revisión de la USP XVIII", 1970, decide que el control microbiológico de formas farmacéuticas no estériles debe ser llevado a cabo, por la industria farmacéutica, como una medida preventiva, y que el análisis debe realizarse principalmente en aquellas formulaciones que involucren dentro de sus ingredientes aquellas sustancias de origen animal o vegetal, recomendando un control microbiológico previo sobre las materias primas así como en el estado intermedio de producción de la forma farmacéutica. Estos controles deben tomar en cuenta la existencia así como la eficiencia del conservador y el proceso de fabricación de cada producto en especial, además debe contemplarse la existencia o ausencia de los principales microorganismos así como de los gérmenes oportunistas que pudieran ocasionar algún mal dado el caso.

## O B J E T I V O

El objetivo de nuestro estudio tuvo como propósito principal el establecimiento de los métodos adecuados tanto para la cuantificación de microorganismos viables, como para la detección e identificación de aquellos que son patógenos para la especie humana y que se encuentran en las materias primas usadas en la preparación de formulaciones farmacéuticas no estériles, tomando en consideración para la implementación de estos métodos la rapidez, confiabilidad y economía que de estos se requiere en un análisis cotidiano. Como propósito secundario se trató de determinar la contribución que las condiciones ambientales y de operación observada durante el proceso de fabricación aportan para el aumento o disminución del nivel de contaminación microbiológica de formas farmacéuticas no estériles.

## PARTE EXPERIMENTAL

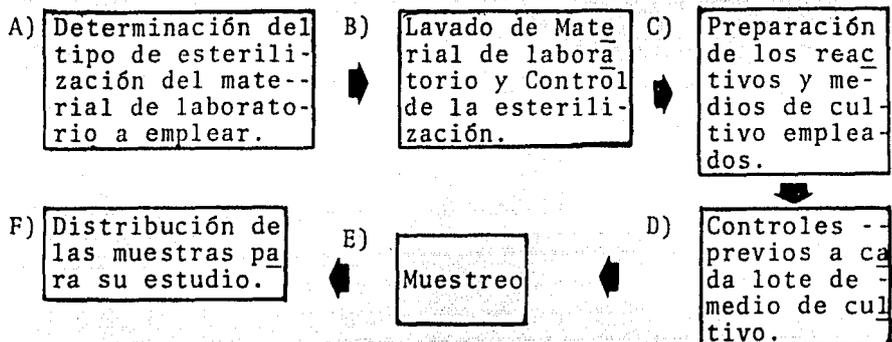
### I. - DETERMINACION DE LAS FORMAS FARMACEUTICAS Y MATERIAS PRIMAS A ESTUDIAR.

De acuerdo al nivel de aceptación que tienen en el mercado fueron elegidos los siguientes productos enumerados a continuación estudiándose las materias primas que les dan origen, para detectar, cuantificar e identificar los principales microorganismos -- contaminantes de formas farmacéuticas no estériles:

- 1) SOLUCION DE VITAMINAS A Y D  
(Dosis Única Oral)
- 2) SOLUCION DE VITAMINA A  
(Gotas)
- 3) SOLUCION DE VITAMINAS A, D Y C  
(Gotas)
- 4) SOLUCION ANTIESPASMODICA  
(Gotas)
- 5) SOLUCION ANTIESPASMODICA CON SEDANTE  
(Gotas)
- 6) ANALGESICO  
(Tabletas)
- 7) ANALGESICO ANTIHISTAMINICO-a  
(Tabletas)
- 8) ANALGESICO ANTIHISTAMINICO-b  
(Tabletas)

- 9) ANALGESICO ORAL NO NARCOTICO  
(Tabletas)
- 10) MULTIVITAMINICO  
(Cápsulas)
- 11) CAPSULAS DE VITAMINA A  
(Cápsulas)

## II.- DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO TOTAL



### A) DETERMINACION DEL TIPO DE ESTERILIZACION DEL MATERIAL DE LABORATORIO A EMPLEAR

La esterilización es el proceso mediante el cual un objeto o material se libera de cualquier tipo de microorganismos vivos y sabemos que este término es absoluto y que puede llevarse a cabo mediante la exposición del objeto por esterilizar, a agentes químicos y físicos, y que dependiendo de la termolabilidad del material u objetos se determinará el tipo de esterilización más adecuada para todo el material que se empleará en este estudio.

Para material termolabil como medios de cultivo, soluciones reactivas, mangas desechables, y material de plástico y sus derivados como por ejemplo; guantes, mangueras, tapones, etc., se determinó que el procedimiento mediante el cual estos objetos quedarían libres de gérmenes contaminantes, sería por medio de calor húmedo a una presión de 15 lb/pulg.<sup>2</sup>

Para el material de vidrio como por ejemplo: frascos para toma de muestras, tubos de cultivo, matraces erlenmeyer y redondos de fondo plano, cajas petri, embudos de filtración, etc., así como

para material no termolábil se eligió el esterilizado en horno - por calor seco a altas temperaturas (180°C durante 3 hrs.)

B) LAVADO DE MATERIAL Y CONTROL DE LA ESTERILIZACION

a) Lavado del Material.

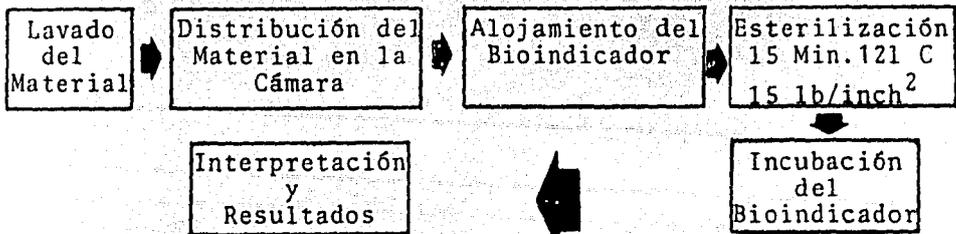
El lavado del material debe hacerse usando un detergente el cual sea "biodegradable" y por lo tanto no ejerza ningún efecto que - inhíba el crecimiento normal de cualquier microorganismo, y en - seguida enjuagando con suficiente agua destilada.

b) Control del nivel de esterilización del autoclave.

Este control se hace con el fin de determinar el nivel de confian- za que se va a tener durante el proceso de esterilización de los diferentes materiales usados en cada una de las pruebas que se - lleven a cabo; la prueba se realiza por medio de un indicador bio- lógico, el cual es una suspensión de esporas de *B. stearothermo- philus* que no es patógeno, suspendido en caldo nutritivo con adi- ción de azúcar y un indicador colorido de PH.

La termorresistencia de estas esporas se haya de tal forma ajust- tada que por calentamiento a presión de vapor, sólo mueren luego de 15 min. de exposición a una temperatura no menor a 121°C. Las esporas sobreviven a temperaturas más bajas y a tiempos de exposi- ción menores.

RESUMEN PASOS SEGUIDOS:



El procedimiento es el siguiente:

- 1) Se distribuye el material limpio dentro de la cámara del autoclave de tal manera que el vapor fluya a través de toda la superficie del material.
- 2) Se coloca el BIOINDICADOR, que va dentro de un recipiente --tratando de simular las condiciones del material a esterilizar, distribuido de tal forma que la prueba sea representativa.
- 3) Se lleva a cabo la esterilización durante un lapso de 15 --- min. con una presión de 15 lb/pulg.
- 4) Se sacan las ampollitas que contienen al bioindicador, y se incuban a una temperatura de 55°C durante 48 hs.
- 5) Interpretación de resultados:

Si la esterilización fue suficiente las esporas de *B. stearothermophilus* fueron destruidas y la ampollita permanece color violeta.

Si la esterilización ha sido insuficiente, luego de algunas horas de incubación el contenido suele mostrar turbidez y un cambio al color amarillo por la formación de ácido a consecuencia de la fermentación del azúcar.

C) PREPARACION DE LOS REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO A EMPLEAR

a) Preparación de los reactivos

Solución Amortiguadora de Fosfatos.

Disolver 34 g. de Fosfato Monobásico de Potasio en aproximadamente 500 ml. de Agua destilada dentro de un matraz aforado de --- 1000 ml. Ajustar a pH de 7.2 mediante la adición de solución titulante de Hidróxido de sodio (aprox. 175 ml), adicionar y llevar al volumen con agua destilada. Guardar bajo refrigeración. Tomar

1 ml. de esta solución y llevar a un volumen final de 800 ml. mediante la adición de agua destilada, para obtener una dilución - de 1;800 de la solución original de fosfatos.

#### Solución Yodo-Yodurada

Disolver 0.5 g. de Yodo (I)<sub>2</sub> y 1.5 g. de Yoduro de Potasio (KI) - en aproximadamente 25 ml. de Agua destilada.

#### b) Preparación de medios de cultivo.

Se emplearon medios de cultivo comerciales previamente preparados y deshidratados, cuyas fórmulas son las indicadas por los libros oficiales y cuya preparación consiste en disolver la cantidad indicada en una preparación exacta de agua destilada y calentar en caso de ser indicada esta operación en el marbete del medio.

Los medios de cultivo empleados fueron:

#### MEDIOS DE CULTIVO UNIVERSALES

Agar peptona de caseína-peptona de harina de soya.

Caldo peptona de caseína-peptona de harina de soya.

#### MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS

Caldo-Lactosa

Agar Verde Brillante Rojo de Fenol Lactosa Sacarosa.

Agar Xilosa Lisina Desoxicolato

Agar Bismuto Sulfito seg. Wilson Blair

Agar de MccConkey

Agar para Staphilococcus seg. Vogel-Johnson

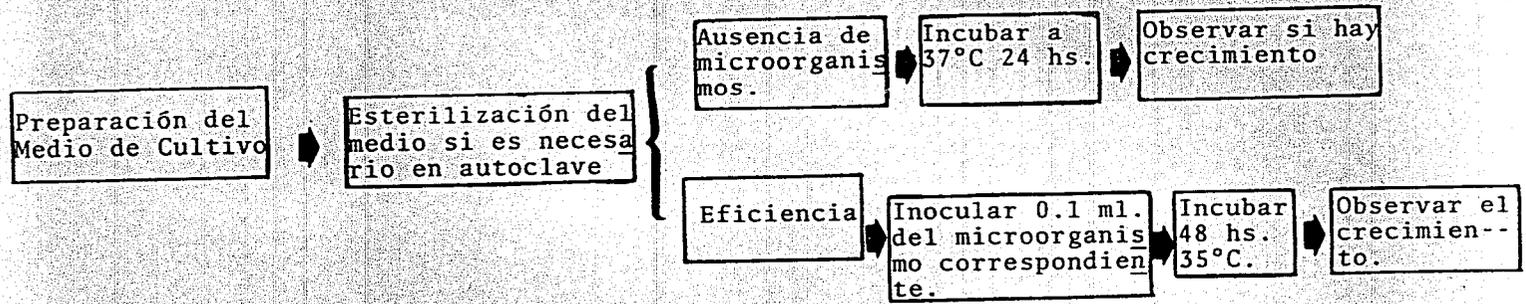
Agar Cetrimide

#### MEDIOS DE CULTIVO DIFERENCIALES

Agar Hierro tres Azúcares

Agar Eosina Azul de Metileno

b) CONTROLES PREVIOS A CADA LOTE DE MEDIOS DE CULTIVO



Un control previo de cada lote de medio de cultivo es necesario para cerciorarse de que el medio, listo para su uso, no contenga sustancias que inhiban al crecimiento normal de los microorganismos de siembra, y que a la vez no contenga ninguna clase de gérmenes que lo contaminen por un defecto en la esterilización o por causa de la pérdida de selectividad del medio de cultivo. Para esta clase de controles se sigue el siguiente camino:

a) Preparación del medio. Esto implica su completa solubilización o su adecuada dispersión dentro del disolvente.

b) Esterilización (si es necesaria). Solamente se hará en aquellos medios que no contengan sustancias termolábiles, para prevenir cualquier pérdida en la selectividad de los medios de cultivo.

c) Controles.

1) Control de ausencia de microorganismos en el medio de cultivo. Incubar el medio de cultivo una vez que fue distribuído en cajas o tubos a una temperatura de 37° C. durante 24 hs.

2) Control de eficiencia del medio de cultivo

I) Inocular 0.1 ml. de un cultivo de 24 hs. de existencia del microorganismo correspondiente.

II) Incubar las placas o tubos durante 48 hs. a 35°C

d) Interpretación de Resultados.

1) Control de ausencia de microorganismos en el medio de cultivo. La prueba es satisfactoria cuando transcurrido el tiempo de incubación no se presenta crecimiento alguno en el medio de cultivo.

Si hay algún crecimiento en el medio es indicio de una esterilización inadecuada o de una pérdida de selectividad del medio.

2) Control de eficiencia del medio de cultivo.

La prueba es satisfactoria si se observa un crecimiento normal -- del microorganismo de prueba después del período de incubación.

Una ausencia del crecimiento denotará la presencia de sustancias bacteriostáticas o bactericidas dentro del medio.

E) MUESTREO

El muestreo debe llevarse a cabo de una manera aséptica, por lo tanto el supervisor debe estar capacitado para este tipo de trabajo y debe estar provisto del equipo necesario como cofia, tapabocas y guantes y tener a la mano un frasco con tapa así como una espátula, para depositar la muestra, todo esto previamente esterilizado.

Las muestras deben de ser representativas de todo el lote; entendiéndose por lote una cantidad de producto, la cual fue preparada en un sólo proceso a partir de una cantidad definida de sustancia, -- por lo que se considera que el riesgo de contaminación es el mismo para todo el lote.

Las cantidades de muestra tomadas por lote son las siguientes:

MATERIAS PRIMAS: 3 muestras de 10 ml. ó 10 g. o una sola que contenga 40 g. ó 40 ml. de sustancia. De estas, la muestra estará destinada a la determinación del número de gérmenes y las muestras 2 y 3 a la determinación del tipo de gérmenes.

PRODUCTO TERMINADO:

5 muestras del producto final, a lo sumo 2% del total del lote, máximo 20 unidades en líquidos el contenido de cada dosis - es mezclado con los demás en un recipiente estéril.

F) DISTRIBUCION DE LAS MUESTRAS PARA SU ESTUDIO

MATERIAL DE  
EXAMEN  
3 MUESTRAS  
DE  
10 g ó 10 ml.

MUESTRA 1

DETERMINACION DEL NUMERO TOTAL  
DE GERMESES CONTAMINANTES

MUESTRA 2

DETECCION E IDENTIFICACION DE -  
SALMONELLA Y E COLI

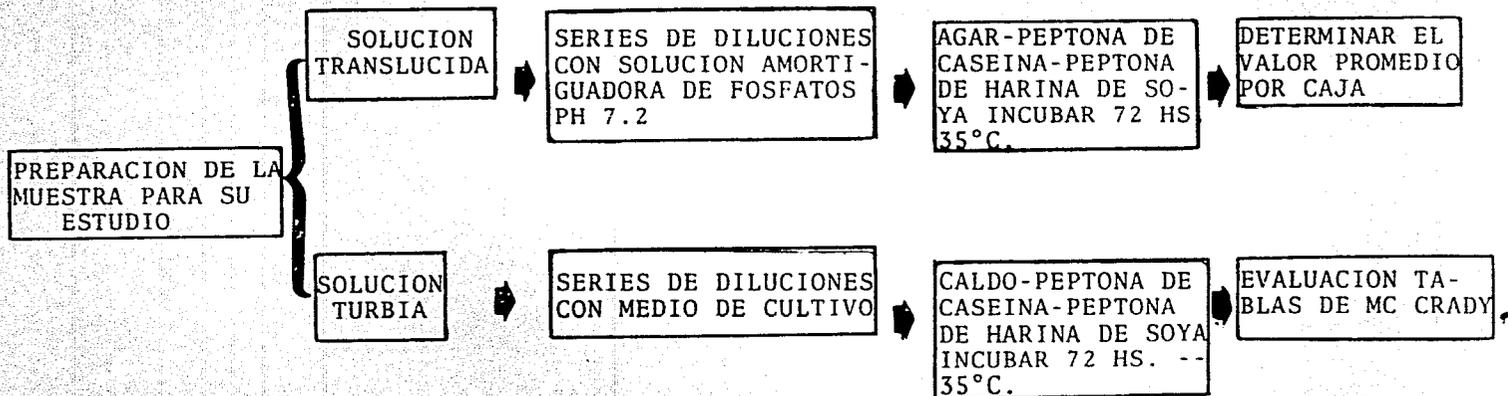
MUESTRA 3

DETECCION E IDENTIFICACION DE -  
S AUREUS Y P AERUGINOSAS

Para la determinación del número total de gérmenes contaminantes de la muestra, debe diluirse rápida y uniformemente bajo condiciones asépticas, debiéndose pasar a continuación a los medios de cultivo estériles.

MUESTRA 1 DETERMINACION DEL NUMERO TOTAL DE GERMEENES CONTAMINANTES

Resumen de los pasos seguidos.



## PREPARACION DE LA MUESTRA

### I) Muestras fáciles de suspender.

Se pasan 10 g ó 10 ml. de muestra, bajo condiciones asépticas a un matraz volumétrico de 100 ml. previamente esterilizado y se disuelven con aproximadamente 50 ml. de solución amortiguadora de fosfatos (ph 7.2) estéril y a la temperatura del medio ambiente, una vez disuelto el soluto se lleva al aforo con la misma solución amortiguadora de fosfatos. De esta solución hacer diluciones hasta tener concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 con solución amortiguadora de fosfatos (ph 7.2)

### II) Muestras difíciles de suspender.

Se pasan 10 g o 10 ml. de muestra, bajo condiciones estériles, a un matraz arlenmeyer estéril, y se suspenden con aproximadamente 50 ml. de solución amortiguadora de fosfatos (ph 7.2) estéril y a una temperatura de 40° C con agitación continua. Una vez suspendido el soluto se pasa a un matraz volumétrico estéril de 100 ml. y se lleva al volumen con solución estéril de fosfatos.

Si la muestra preparada es translúcida se sigue el método de "Vertido en Placa", y si esta es turbia se seguirá el método de "Dilución en Tubos".

### METODO DE VERTIDO EN PLACA

- I) Transferir alícuotas para obtener diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 de la muestra preparada, con solución amortiguadora de fosfatos estéril (ph 7.2)
- II) Bajo condiciones estériles transferir un ml. de cada dilución a cuatro cajas petri estériles. Estas deben de estar marcadas y plenamente identificadas.

- III) Adicionar 20 ml. de medio de cultivo agar-peptona de caseína-peptona de harina de soya estéril y enfriado a una temperatura entre  $40^{\circ}$  y  $45^{\circ}$  C a cada una de las cajas, homogenizar y dejar solidificar.
- IV) Invertir las cajas e incubarlas por 72 hrs.
- V) Para la determinación del número de gérmenes, se observan en dos placas de la misma dilución el número de colonias, a partir de esta cifra se determina el contenido promedio de colonias por placa el cual se multiplica por el factor de dilución para de esta forma, obtener el número de microorganismos formadores de colonias por gramo ó mililitro de muestras.

#### METODO DE DILUCION EN TUBOS

- I) Se preparan 14 tubos con 9 ml. cada uno, de caldo peptona de caseína-peptona de harina de soya los cuales son esterilizados a  $121^{\circ}$  C por 15 min. en autoclave.
- II) A cuatro de estos tubos se les adiciona, bajo condiciones estériles, 1 ml. respectivamente de la muestra ya preparada y se mezcla. (primera serie)
- III) Del cuarto tubo de la primera serie se toma un ml. para cada uno de los siguientes cuatro tubos (segunda serie) bajo condiciones estériles. El tubo donador se desecha.
- IV) Del cuarto tubo de la segunda serie se toma un ml. para cada uno de los siguientes tres tubos, bajo condiciones estériles. El tubo donador es desechado.
- V) Los tres tubos sobrantes forman una cuarta serie sin siembra y sirven como control. Estos deberán permanecer iguales después de la incubación.
- VI) Los tubos se incuban a una temperatura de  $35^{\circ}$ C durante - - 72 hs.

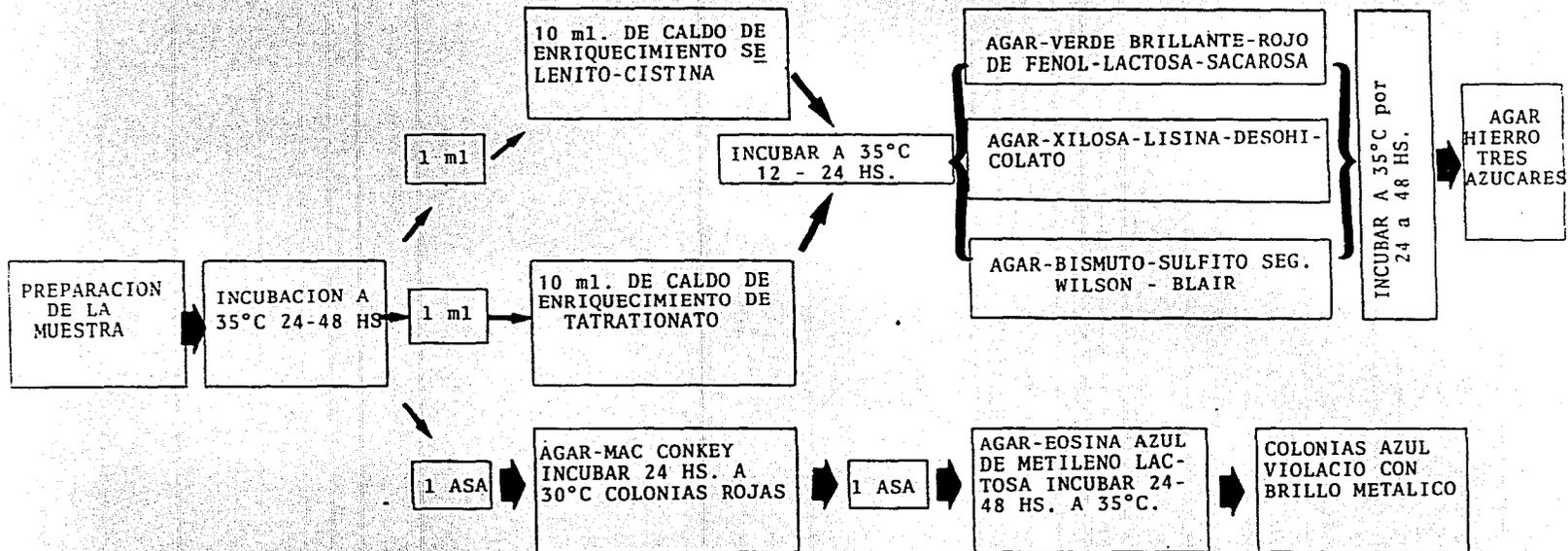
VII) La determinación del número total de microorganismos presentes se realiza con ayuda de la tabla de probabilidades según Mac Crady.

NOTA:

Para cada examen se corre un blanco contaminado el cual es tratado de la misma forma que el problema, desde la preparación de la muestra hasta la interpretación. Es decir, se trata de la misma forma durante todo el procedimiento, con el fin de que la prueba hecha tenga validez y al mismo tiempo sea un parámetro de comparación.

MUESTRA 2 DETERMINACION DE E COLI Y ESPECIES DE SALMONELLA

Resumen de los pasos seguidos.



## MUESTRA 2 DETERMINACION DE E COLI Y ESPECIES DE SALMONELLA

### PREPARACION DE LA MUESTRA

I) Muestras fáciles de suspender y/o disolver

Se pasan 10 g. ó 10 ml. de muestra, bajo condiciones estériles a un matraz erlenmeyer que contenga aproximadamente 90 ml. de caldo-lactosa estéril, se agita hasta una suspensión completa en el medio. Se incuba entre 30 y 35° C. durante 12 hs.

II) Muestras difíciles de suspender

Se pasan 10 g. ó 10 ml. de muestra, en condiciones estériles a un matraz erlenmeyer que contenga aproximadamente 90 ml. de caldo-lactosa estéril, a una temperatura de 40 C. y 0.1 ml. de polisorbato 80, y se mantiene en constante agitación hasta la homogenización completa de la suspensión. Se incuba entre 30 y 35° C durante 12 hs.

### PARA LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DE SALMONELLA

I) Se añade a un tubo el cual contiene 1 ml. de caldo-lactosa incubado, 10 ml. de caldo de enriquecimiento de selenito-cistina, y otro igual, 10 ml. de caldo de enriquecimiento de tetracionato. Este procedimiento se realiza en condiciones estériles.

II) Se incuban durante 12 hs. a una temperatura de 35°C.

III) Se resiembran de los medios enriquecidos a los medios selectivos siguientes por medio del asa:

Agar-verdebrillante-rojo de fenol-lactosa-sacarosa

Agar-xilosa-lisina-desoxicolato

Agar-sulfito-bismuto- seg. Wilson Blair

IV) Se incuban durante 48 hs. a una temperatura de 35° C.

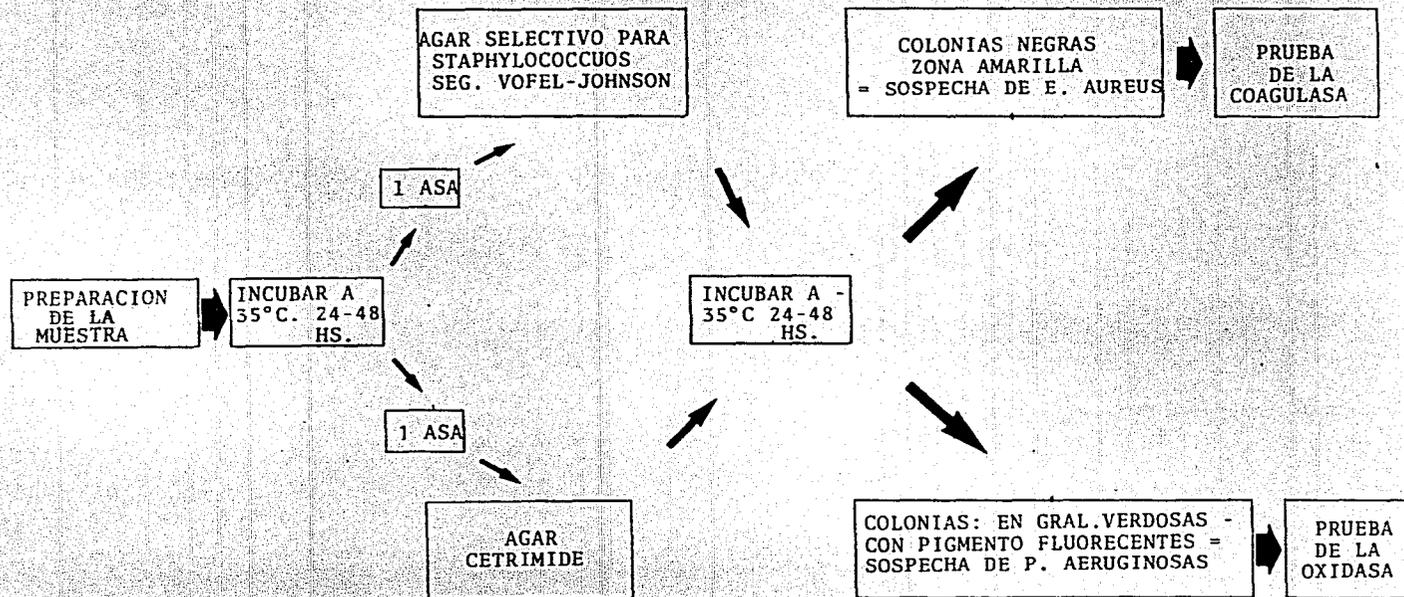
- V) Las colonias sospechosas se resiembran, por picadura y en superficie inclinada; en Agar-hierro-tres azúcares y se incuban durante un período de 12 hs. a una temperatura de 35° C.
- VI) La formación de ácido, coloración amarilla, en la picadura, con producción de gas y una eventual coloración negra en la superficie inclinada, es típica del género salmonella.

#### PARA IDENTIFICACION DE ESCHERICHIA COLI

- I) Se resiembran del caldo-lactosa incubado, por medio de la asa, al agar Mac Conkey y se incuban durante 24 hs. a una temperatura de 35° C.
- II) Las colonias color rojo ladrillo provistas, eventualmente de halos de precipitación son típicas de E coli.
- III) Si el aspecto de la colonia no es definido se resiembran en agar-eosina-azul de metileno-lactosa seg. Levine y se incuban a una temperatura de 35° C durante un período de 48 hs
- IV) Las colonias de E coli se caracterizan por su color negro azulado a transluz y su brillo metálico a la luz incidente

MUESTRA 3 DETERMINACION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSAS Y STAPHYLOCOCCUOS AUREUS

Resumen de los pasos seguidos



## MUESTRA 3 DETERMINACION DE P. AERUGINOSAS Y S. AUREUS

### PREPARACION DE LA MUESTRA

#### I) Fáciles de suspender

Se pasan 10 g. ó 10 ml. de muestra, en condiciones estériles a un matraz erlenmeyer que contenga aproximadamente 90 ml. de caldo-peptona de caseína-peptona de harina de soya estéril. Se mezcla hasta la completa homogenización de la suspensión.

#### II) Muestras difíciles de suspender.

Se pasan 10 g. ó 10 ml. de muestra, en condiciones estériles a un matraz erlenmeyer que contenga aproximadamente 90 ml. de caldo-peptona de caseína-peptona de harina de soya estéril, a una temperatura de 40<sup>o</sup> C. y 0.1 ml. de polisorbato 80, suspender con agitación continua hasta la homogenización de la suspensión.

Las muestras son incubadas a una temperatura de 35<sup>o</sup> C por un período de 24 hs. aproximadamente hasta la iniciación del crecimiento.

### PARA IDENTIFICACION DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

- I) Se resiembra del caldo-peptona de caseína-peptona de harina de soya, por medio del asa y con el método de la dilución, en Agar selectivo para Staphylococcus según Vogel Johnson, en condiciones estériles.
- II) Se incuba durante un período de 48 hs. a una temperatura de 35<sup>o</sup>C.
- III) Si aparecen unas colonias negras en una zona amarillenta se realiza la prueba de la coagulasa.

- IV) Transferir las colonias sospechosas que sean representativas, de la superficie del medio de cultivo, a tubos individuales que contienen 0.5 ml. de plasma de conejo, con o sin aditivos, incubar en baño de agua a una temperatura constante de 37° C. examinando los tubos después de 3 hs. y subsecuentemente en intervalos apropiados, la lectura - se hace después de 24 hs. de incubación.

PARA IDENTIFICACION DE PSEUDOMONAS AERUGINOSAS

- I) Se resiembra del caldo-peptona de caseína de harina de soya, por medio del asa y con el método de la dilución, - - Agar Cetrimide, en condiciones estériles.
- II) Se incuba a una temperatura de 35°C durante un período de 48 hs.
- III) Si aparecen colonias verdosas fluorescentes en el Agar Cetrimide se realizará la prueba de la Oxidasa.  
Se colocarán por encima de las colonias sospechosas tiras de papel filtro, las cuales deberán de estar impregnadas de solución de "Dicloruro de N, N-dimetil-p-fenildiamonio.
- IV) Si aparece una coloración roja o púrpura indicará la pre--sencia de Pseudomonas aeruginosas.

RESULTADOS. Materia Prima  
NIVEL MICROBIOLÓGICO DE MATERIAS PRIMAS

Materia Prima (nombre)	Lote	Cuenta Total de Microorganismos	Escherichia Coli	Especies de Salmonella	Pseudomonas Aeruginosas	Staphylococcus Aureus
Polisorbato 80, U.S.P.	D 7173	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Sorbitol, U.S.P.	D 7156	15 mcg/ml.	negativo	negativo	negativo	negativo
Glicerina, U.S.P.	D 7129	100 mcg/ml.	negativo	negativo	negativo	negativo
Propilenglicol, U.S.P.	D 6992	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Metil Parabeno, U.S.P.	D 7042	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Sacarina Sódica, N.F.	D 7094	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Almidón Pregelatinizado de Tapioca, -- U.S.P.	Muestra	460 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Almidón Pregelatinizado de Maíz, -- U.S.P.	D 7082	210 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Celulosa Microcristalina PH 101, N.F.	D 7114	120 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Celulosa Microcristalina PH 102, N.F.	D 7126	93 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Almidón de Maíz Globe, U.S.P.	D 6984	150 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Aspirina, U.S.P.	D 7073	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Acetaminofen, U.S.P.	D 7223	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Cápsulas de gelatina dura (vacías)		43 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Agua purificada, U.S.P.		cero	negativo	negativo	negativo	negativo

.RESULTADOS. Producto Terminado  
NIVEL MICROBIOLOGICO DE PRODUCTO TERMINADO

Nombre del Producto	Lote	Cuenta Total de Microorganismos	Escherichia Coli	Especies de Salmonella	Pseudomonas Aeruginosas	Staphylococcus Aureus
Solución Vitaminas A y D (dosis única)	LE001	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Solución Vitaminas A y D (dosis única)	LL001	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Solución Vitaminas A y DC (gotas)	LE016	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Solución Vitamina A (gotas)	LJ008	cero	negativo	negativo	negativo	negativo
Solución Antiespas m <sub>d</sub> ica (gotas)	LL013	13 mcg/ml.	negativo	negativo	negativo	negativo
Solución Antiespas m <sub>d</sub> ica sedante -- (gotas)	LJ002	20 mcg/ml.	negativo	negativo	negativo	negativo
Analgésico Antihi <sub>s</sub> tamínico - a (tabletas)	LL011	23 mcg/ml.	negativo	negativo	negativo	negativo
Analgésico, Antihi <sub>s</sub> tamínico - b (tabletas)	LL012	25 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Analgésico (tabletas)	LJ004	43 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Analgésico No Narcótico (tabletas)	LK005	93 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Multivitamínico (cápsulas)	LJ001	150 mcg/g.	negativo	negativo	negativo	negativo
Cápsulas de Vitamina A (cápsulas de Gelatina Blanca).	IM001	cero	negativo	negativo	negativo	negativo

## D I S C U S I O N

Durante la realización de este estudio se determinó poner en práctica los métodos apropiados para la cuantificación de microorganismos saprófitos, así como para la detección e identificación de aquellos gérmenes patógenos para el hombre, que más frecuentemente son reportados en la literatura como agentes contaminantes de formas farmacéuticas no estériles, acoplándolos de una forma tal, que la familiarización con cada método fuera fácil y rápida permitiendo de este modo que la realización de cada una de las pruebas se llevara a cabo de la forma más sencilla posible, en el menor tiempo requerido y con el más bajo costo total, ofreciendo al mismo tiempo seguridad plena en los resultados que arrojaran estas pruebas.

Por otra parte se determinó conocer cual es la influencia de las condiciones ambientales y de ejecución durante el proceso de fabricación, así como la de algunas sustancias, al incremento o disminución del nivel de contaminación microbiológica de las formas farmacéuticas no estériles que se eligieron para el estudio.

Para lograr lo anterior, fue necesario dar:

Un tratamiento adecuado a cada muestra bajo estudio; con el fin de evitar cualquier alteración del contenido inicial de gérmenes a través de los diferentes pasos seguidos antes y durante la realización de cada una de las pruebas.

Un razonamiento anticipado del método elegido, así como el conocimiento de las características físicas y químicas de cada muestra bajo estudio, con el fin de determinar el procedimiento más lógico en la preparación de cada una de las muestras, las cantidades óptimas de medio de cultivo y el material de laboratorio apropiado

Este estudio consistió en determinar la contaminación total de un producto en especial, solución de Vitamina A y D hidrosolubles en dosis única, la cual contenía Polisorbato 80 en una concentración de arriba del 20% de la formulación total, y el efecto de esta sustancia sobre los contaminantes de este producto se realizó de la manera siguiente:

- a) Se determinó el nivel de contaminación microbiológica de cada una de las materias primas que serían utilizadas en la elaboración de este producto. (Lote LL001)
- b) Se llevó a cabo el estudio microbiológico para determinar la contribución de estas materias primas, a la contaminación del producto elaborado, para lo cual fue necesario llevar a cabo las siguientes disposiciones en condiciones asépticas:
  - I) Se tomó una parte del lote LL001 a granel, aproximadamente 250 ml. y se contaminó con microorganismos patógenos tales como *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y se mantuvieron a una temperatura constante de 35°C durante un período de 48 hs.
  - II) Otra parte del mismo lote aproximadamente 250 ml. se mantuvo en condiciones normales y se incubó en una temperatura de 35°C durante 48 hs.

En seguida se filtraron a través de filtros de membrana con porosidad de  $0.45 \pm 0.02$   $\mu$  de diámetro, lavando la membrana con una solución estéril de peptona al 1%. A continuación se determinó el número total de gérmenes, usando las membranas como muestra número 1, con el fin de confirmar la acción bactericida ó bacterioestática en el problema contaminado y usando como blanco el problema control.

do para la realización de cada una de estas pruebas.

En cuanto a la determinación de la influencia que tiene el medio ambiente y operacional en el aumento o disminución del nivel de contaminación de formas no estériles, se tomó como un parámetro de comparación, el nivel de contaminación que guardaban inicialmente las materias primas que serían utilizadas en la manufactura de cada uno de los productos escogidos. En base a este acuerdo, se encontró que el índice de contaminación inicial de cada una de las materias primas estudiadas, en ningún momento excedió los límites ya prescritos para la cuenta total de microorganismos viables presentes (saprofitos) por gramo de muestra, observando al mismo tiempo la ausencia total, de los microorganismos patógenos que se trataron de detectar en cada muestra y que fueron E. coli, cualquier especie del género Salmonella, Pseudomonas aeruginosas y Staphylococcus aureus. Estos resultados dan una idea de la calidad de las materias primas que son usadas en la fabricación de productos farmacéuticos no estériles.

En el análisis microbiológico hecho en las diferentes formas farmacéuticas elegidas para su estudio y que cuyos precursores fueron las materias primas antes mencionadas, se encontró:

Que en las formas farmacéuticas sólidas no estériles tal como tabletas, las cuentas totales de microorganismos viables presentes, eran bajas y a la vez había ausencia de gérmenes patógenos, con lo que se demostró que las condiciones que guarda el medio ambiente y operacional durante el proceso de fabricación desde el punto de vista microbiológico, eran desfavorables para la proliferación de esta clase de contaminantes, debido principalmente a las

normas de higiene seguidas por el personal y las medidas asépticas que se siguen como un factor preventivo antes y durante cada proceso de fabricación de esta clase de formas farmacéuticas.

Por otro lado podemos observar que la contaminación presente en este tipo de presentación farmacéutica tiene como principal aportador a las materias primas que usadas como excipientes, son de origen vegetal ó animal, y esta aportación es más o menos proporcional al porcentaje en el que son usadas dentro de la formulación. En el caso de los activos, en este estudio, se determinó que su aportación a la contaminación total era nula, ya que la forma de obtención de estos, por medio de reacciones químicas, no favorecen al desarrollo de microorganismos en estas sustancias.

En las formas farmacéuticas sólidas no estériles como "Cápsulas de Gelatina Dura" encontramos que el número total de microorganismos (saprófitos), presentes en esta forma fue elevado pero no se encontró indicio alguno de la presencia de gérmenes patógenos como son *Pseudomonas aeruginosas*, y *Staphylococcus aureus* o de indicadores de falta de asepsia en el proceso como son *Escherichia coli* y cualquier especie del género *Salmonella*. La elevación en el nivel de contaminación total de este tipo de formulación no fue proporcional al porcentaje con el que contribuyen las materias primas a este fin, por lo que es de suponerse que este problema podemos atribuirlo a una multiplicación de los microorganismos contaminantes, dentro de la forma farmacéutica, pues dentro de las materias primas que la constituyen se encuentran algunas vitaminas, por lo que, esta formulación puede ser un medio propicio para la multiplicación de estos contaminantes o bien falta de higiene

en la manipulación de los polvos durante el encapsulado, lo cual no pudo ser comprobado hasta el momento de escribir este trabajo, debido a que esta parte del proceso se realiza en un laboratorio auxiliar de maquila y se encuentra bajo estudio.

Los productos presentados en la forma farmacéutica líquida oral-no estéril de "Solución", la cuenta total de microorganismos fue baja y en proporción directa a la cantidad de materia prima presente en la formulación, en la cual no se encontró ningún indicio de microorganismos patógenos tales como E. coli, miembros del género Salmonella, Pseudomonas aeruginosas y Staphylococcus aureus como parte de la contaminación de estas formas.

En el estudio de formas farmacéuticas no estériles semi sólidas - como "Cápsulas de Gelatina Blanda", las cuales contienen en su seno una solución viscosa de Vitamina A, se observó que la cuenta total de microorganismos era igual a cero y por lo tanto se encuentran ausentes de E. Coli, P. aeruginosas, pese a que la aportación de la materia prima a la elevación del nivel de contaminación total existía y a la vez se pensaba que esta formulación presentaba un medio favorable para el desarrollo de esta clase de microorganismos; esta misma situación se encontró en todas las formulaciones orales no estériles que involucran dentro de las materias primas al Polisorbato 80, en una concentración alta, no encontrándose indicio alguno de contaminación microbiana. Conociendo las propiedades de esta materia prima se determinó conocer su acción en altas concentraciones sobre los microorganismos que más comúnmente se encuentran contaminando formas farmacéuticas no estériles - como son: P. aeruginosas, S. aureus, E. coli y cualquier miembro del género Salmonella.

R E S U L T A D O S:

	<u>MATERIAS PRIMAS</u>	<u>LOTE</u>	<u>CUENTA TOTAL DE GERMENES</u>
SOLUCION DE VIT. A Y D HIDROMICIBLES LL001	Polisorbato 80, USP	7131	CERO +
	Glicerina, USP	7129	100 col/ml +
	Metil-Parabeno, USP	7042	CERO +
	Sacarina Sódica, NF	7094	CERO +
	Propilenglicol, USP	6972	CERO +
	Alcohol 95%, USP		CERO +

+ Estas muestras están libres de Escherichis coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas, aeruginosas, y de cualquier especie del género Salmonella, pues las pruebas para la detección e identificación de estos microorganismos fueron negativos.

ESTUDIOS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL POLISORBATO 80 EN CONCENTRACIONES ALTAS	I) SOLUCION DE VIT AyD (contaminada)	3 días de filtración	7 días de incubación
	II) SOLUCION DE VIT AyD (normal)	3 días de filtración	7 días de incubación
	III) SOLUCION DE PEP-TONA AL 1% ESTERIL	3 días de filtración	7 días de incubación
	IV) MEDIO DE CULTIVO CONTAMINADO DELIBERADAMENTE	7 días de incubación	

Los resultados anteriores arrojan a la vista la posibilidad de que esta sustancia (Polisorbato 80) usada en una concentración --

elevada, arriba del 20%, dentro de la formulación de una solución farmacéutica ejerza un efecto bactericida hacia microorganismos tales como *Escherichia coli*, especies del género *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, y *Pseudomonas aeruginosa*s y por lo tanto impide el desarrollo de microorganismos saprófitos.

Una posible explicación a este efecto es que posiblemente el Polisorbato 80 solubilice la pared celular por un mecanismo semejante al de la enzima "Lizosima", o sea rompiendo el enlace del glucosamina y ácido murámico. Pues como sabemos las paredes celulares de los microorganismos Gram negativos tanto como las de los Gram positivos contienen la misma sustancia química que forma el contenido básico de la estructura rígida de la pared. Este material es un polímero complejo que contiene dos aminoazúcares, glucosamina y ácido murámico, y varios aminoácidos. El ácido murámico que se encuentra en las paredes de las células bacterianas es único y no se conoce ningún otro tipo de estructura que contenga este azúcar. Estos componentes simples se reúnen para formar una estructura química, muy compleja de enlaces unidos transversalmente llamada Mureina, que es la que produce la rigidez de la célula. La acción solubilizante del Polisorbato 80 liberaría el cuerpo celular, que aún es viable, pero susceptible a los cambios de presiones, y como la característica principal del Polisorbato 80 es abatir la tensión superficial, puede ocurrir un cambio en la presión osmótica y por consiguiente el cuerpo viable sería destruido.

## C O N C L U S I O N E S

1. Se establecieron los métodos microbiológicos adecuados para la cuantificación de microorganismos viables (saprófitos) - como para la detección e identificación de *Escherichia coli*, especies del género *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* como contaminantes de formas farmacéuticas no estériles, así como el camino a seguir en estas determinaciones. Con el fin de sentar las bases para el análisis microbiológico cotidiano de materias primas y de los productos que se producen en este laboratorio y que son susceptibles a la contaminación debido a su composición.
2. La contribución principal para la elevación del nivel de contaminación microbiana en formas farmacéuticas no estériles es aportada por las materias primas que se emplean en la preparación de la forma final, principalmente aquellas que son de origen vegetal o animal.
3. Con el fin de evitar un aumento desmedido de la contaminación en el producto final es necesario el control microbiológico de cada materia prima que será usada en la preparación de esta clase de preparaciones farmacéuticas, o sea, se deben utilizar materias primas con un índice de contaminación reducido al máximo y libre de agentes patógenos.
4. Se observó que por lo general las condiciones del medio ambiente que son guardadas durante el proceso de fabricación, de los productos elegidos para su estudio, no son contribuyentes para el aumento del nivel de contaminación microbiológica, excepto en el caso de las cápsulas de gelatina dura en las cuales parte de el proceso de fabricación se lleva a cabo fuera -

del laboratorio. Como resultado de lo anterior se estableció una supervisión más rígida sobre el laboratorio auxiliar de maquila, con el objeto de abatir al mínimo la contaminación microbiológica de este producto.

5. Las formulaciones que contienen entre sus excipientes Polisorbato 80 aparecen libres de contaminación por la acción, supuestamente germicida, de esta sustancia hacia los contaminantes - más frecuentes en estas formas farmacéuticas.

## B I B L I O G R A F I A

1. Vaughn D.G. 1955 American Journal Ophtalmology  
39:55  
Citado por Bruch 1971
2. Lennington K.R. 1969 The FDA's view point.  
Drug and Consuetic Ind. 104  
44:47
3. Kallings L.O., O. Ringertz,  
L. Silvertople y F. Erder-  
feldt. 1966. Microbiological Contamina-  
tion of Medical Preparations  
Acta Pharm. Suecia 3:209-238
4. Federal Register 29  
12 458 Septiembre 1o. 1964
5. Ayliffe, G.A.J., D.R. Barry.,  
J.L. Lowburg, M.J. Roper --  
Hall y W.M. Walker 1966 Postoperative infection with --  
Pseudomonas. Aeurogenosas in eye  
Hospital.  
Lancet J. : 113-117
6. U.S. Departament of Health  
Education and Welfare, Weetly  
Report Morbidity and Morality.  
20 Aug, 3 Dic., PHS. Atlanta --  
1966
7. Doug J. and P. Gerard. 1968 La Contamination Microbienne des  
Médicaments. et J' Etablissement  
de Normes de Qualité Bacteriologi-  
qué. J. Mond Phary. 11:19-32
8. Kallings, L.O. 1971 Contamination of Therapeutic agents.  
Brachman, P.S. and Eickoffitic. -  
Proceding's of the International -  
Conference on Nosocomial Infections  
(Augst 3-6) 1976
9. United Estates Pharmacopeia  
Vol. XVIII Mack Publishmeg Co.  
Easton Pa. 1970
10. Buraon K.L., Robert P.  
Williams Microbiologia 1o. Edición en Es-  
pañol 1974
11. Britsh Pharmacopeia Huso 1973 vol.
12. Diagnostica Merck Control Microbiológico de Calidad  
de productos Farmacéuticos y Mate-  
rias Primas 1o. y 2o. partes.  
E. Merck Darmstadt (R.F. Alemana)