

FALLA DE ORIGEN

57



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

209

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

INACTIVACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE
ANTIBIOTICOS BETA LACTAMICOS EN
AGUAS RESIDUALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

JAIME ROCHA VACIO

U N A M
ZARAGOZA



LO HUMANO
ES
DE NUESTRA DEPENDENCIA

MEXICO, D. F.,

1995



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.

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**INACTIVACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE
ANTIBIOTICOS BETA LACTAMICOS EN AGUAS
RESIDUALES.**

**ASESOR: Q.F.B. A. GUILLERMINA ROJAS FERNANDEZ
SUSTENTANTE: JAIME ROCHA VACIO**

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLO EN EL
DEPARTAMENTO DE VALIDACION DE PROMECO S.A.
DE C. V.**

**A LA MEMORIA DEL PROFESOR
MANUEL VACIO DE LA ROSA QUIEN
SEMBRO EN MI LA SEMILLA DE LA
SUPERACION**

**A MIS PADRES Y HERMANOS POR
SU MOTIVACION, EJEMPLO Y
APOYO DURANTE MI FORMACION
PROFESIONAL**

**A MIS AMIGOS , COMPAÑEROS Y
TODOS AQUEYOS QUE ME
BRINDARON SU APOYO EN LOS
MOMENTOS DIFICILES,**

INDICE.

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| I. FUNDAMENTACION DEL TEMA | 4 |
| 1. Antecedentes | 4 |
| 2. Definición y clasificación de antibióticos | 5 |
| 3. Antibióticos beta-lactámicos | 7 |
| 3.1. Mecanismo de acción | 8 |
| 3.2. Mecanismos de resistencia de microorganismos a los antibióticos beta-lactámicos | 11 |
| 3.3. Estabilidad química del anillo beta-lactámico ante bases | 17 |
| 4. Métodos de cilindro placa para cuantificación de antibióticos | 20 |
| 5. Métodos de inactivación | 21 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 23 |
| III. OBJETIVO | 24 |
| IV. HIPOTESIS | 26 |
| V. MATERIALES Y METODOS | 27 |
| 1. Condiciones óptimas de inactivación de antibióticos beta-lactámicos | 27 |
| 2. Estudio de potencia microbiológica con mezclas de antibióticos | 32 |
| 2.1 Preparación del microorganismo de prueba (<i>S. lutea</i> ATCC 9341) | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2 Preparación de soluciones para curva estandar de mezclas | 34 |
| 2.3 Preparación y toma de muestras | 37 |
| 2.4 Preparación de agar base y agar inóculo para evaluar la potencia microbiológica en mezclas | 37 |
| 3. Estudios de potencia microbiológica para ampicilina | 41 |
| 3.1 Preparación del microorganismo de prueba (<i>S. lutea</i> ATCC 9341) | 42 |
| 3.2 Preparación de soluciones para curva estándar de ampicilina | 43 |
| 3.3 Preparación y toma de muestras | 46 |
| 3.4 Preparación de agar base y agar inóculo para evaluar la potencia microbiológica en mezclas | 47 |
| 4. Determinación del patrón de descarga diario en planta | 50 |
| 5. Inactivación del antibiótico activo en la cisterna de tratamiento | 51 |
| 6. Determinación del hipoclorito residual en las muestras inactivadas | 52 |
| VII RESULTADOS | 54 |
| 1. Condiciones óptimas de inactivación de beta-lactámicos | 54 |
| 1.1 Estudios preliminares | 54 |
| 1.2 Condiciones óptimas | 55 |
| 2. Estudios de potencia microbiológica con mezclas de antibióticos | 56 |
| 3. Estudios de potencia microbiológica con ampicilina | 67 |
| 4. Determinación del patrón de descarga diario en planta | 71 |
| 5. Inactivación del antibiótico activo con hipoclorito de sodio en la cisterna de tratamiento | 74 |

| | |
|--|------------|
| 6.Determinación del hipoclorito residual en las muestras inactivadas | 82 |
| VIII ANALISIS DE RESULTADOS | 83 |
| 1.Determinación de las condiciones óptimas de inactivación | 83 |
| 2.Inactivación de la potencia biológica de antibióticos con mezclas y ampicilina | 84 |
| 2.1 Discusión de curvas potencia microbiológica | 84 |
| 3.Determinación del hipoclorito residual después de la inactivación | 90 |
| IX.CONCLUSIONES | 91 |
| X. SUGERENCIAS | 92 |
| ANEXOS | 94 |
| XI.BIBLIOGRAFIA | 100 |

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

Puede decirse que solamente a partir de la década de los 60(s), términos tales como contaminación del aire, contaminación del agua, medio ambiente, ecología⁽¹⁾, etc. pasaron a ser palabras de uso común y de gran importancia en la actualidad. Por lo anterior, este trabajo trata específicamente la contaminación que producen las aguas residuales sobre el medio ambiente. Las aguas residuales se definen como los desechos líquidos que provienen de las actividades socio-económicas de una comunidad, municipio o ciudad y como tal es una dilución de materia fecal y otros componentes⁽²⁾. Dichas aguas contienen una diversidad de componentes químicos, físicos y biológicos lo cual las hace bastante complejas.

Existen diferentes organismos que regulan y vigilan el tipo de desechos eliminados en las aguas residuales, esto con el objetivo de que no sean un riesgo para los seres humanos y otros seres vivos. En México los organismos encargados de ello son: la SECRETARIA DE DESARROLLO SOCIAL (SEDESOL) y LA SECRETARIA DE SALUD.

Los desechos industriales adquieren gran importancia dado que éstos son los que tienden a perjudicar en mayor medida al medio ambiente.

En el caso de la industria farmacéutica, Salubridad pone gran atención a los antibióticos desechados en las aguas residuales debido a que pueden generar resistencia en la flora microbiana existente en dichas aguas, como es el caso de *Bacillus*, *Pseudomonas*, Coliformes, Enterobacterias, *Salmonellas* y *Shigelas*⁽³⁾. Esta flora bacteriana es causante de diversas enfermedades infecciosas en seres humanos, el control de estas enfermedades se lleva a cabo mediante la prescripción médica de antibióticos, si existiera algún tipo de resistencia hacia estos agentes terapéuticos las

enfermedades no tendrían control, generándose un problema de salud importante.

De lo anterior surge la necesidad de controlar las descargas de aguas residuales que contienen antibióticos. Uno de los controles es la eliminación de la potencia biológica de los antibióticos mediante la transformación o destrucción (inactivación) de su estructura química.

En este trabajo se trataron las aguas residuales de una planta farmacéutica que produce 4 antibióticos Beta-lactámicos (cefamezin, cefizóx, ampicilina y amoxicilina), dichas aguas se trataron con "hipoclorito de sodio"; buscando con ello la eliminación de la actividad biológica de los antibióticos, la cual se presenta por la pérdida del anillo beta lactámico.

Para evaluar la pérdida de la actividad biológica de los antibióticos, la cual se da por la ruptura del anillo beta lactámico, se utilizó el método de potencia a los antibióticos empleando *S. lutea* ATTC 9341 como microorganismo de prueba^(4,5). La evaluación se efectuó posterior al tratamiento de las aguas residuales con hipoclorito de sodio.

Para la inactivación de antibióticos in vitro se encontró que para 10 mg de mezcla de antibióticos (ampicilina, amoxicilina, cefizóx y cefamezin) se requiere de 23.2 mg de hipoclorito de sodio.

Para optimizar la técnica microbiológica de cuantificación de antibióticos se trabajó con mezclas de antibióticos como estándar, variando la concentración del inóculo. Estos estudios mostraron resultados no reproducibles, debido a la falta en el control de tiempos de inoculación y a la modificación del patrón de difusión normal estando los

antibióticos en mezcla.

Dado que los estudios con mezclas no proporcionaron resultados reproducibles se trabajó con un estándar de ampicilina. En los estudios con ampicilina se observó una respuesta lineal en un intervalo de concentración de 0.08 - 0.182 mcg/ml. Este intervalo de concentración se utilizó para cuantificar la descarga diaria de antibióticos en la cisterna de tratamiento; la cantidad de antibiótico activo encontrada fue de 139.12 g. En base a esta cantidad se adicionaron para la inactivación 4 litros de hipoclorito de sodio al 11.7% durante 12 días, la inactivación se evaluó al 6,8 y 11 día, lográndose la inactivación sólo en los primeros 5 días de los doce inactivados.

En vista que la inactivación por 12 días no fue totalmente satisfactoria se adicionaron 8 litros de hipoclorito de sodio al 10.9 % por 3 días y en la evaluación efectuada el tercer día se encontró que la inactivación fue satisfactoria .

De lo anterior se concluyó que la técnica de potencia para antibióticos utilizando un estándar ampicilina era adecuada para evaluar la inactivación y el contenido de antibiótico activo en la cisterna de tratamiento.

I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

I FUNDAMENTACION DEL TEMA.

1. Antecedentes

Desde los años cuarentas en que los antibióticos beta lactámicos fueron descubiertos por Fleming, éstos han adquirido gran importancia, primero por su gran eficiencia terapéutica y actualmente porque se han desarrollado compuestos sintéticos con un amplio espectro antibacteriano. Sin embargo, el uso indiscriminado y en ocasiones el mal uso de los mismos, ha motivado que diversos organismos oficiales, como FDA y SS establezcan diversas regulaciones dirigidas a prevenir la resistencia de los microorganismos hacia los antibióticos y a prevenir el daño a personas sensibles o alérgicas a estos agentes.

Concretamente en la industria farmacéutica las Guías Generales de Buenas Prácticas de Manufactura, establecen que los sitios donde se fabrican beta lactámicos no deben estar junto a áreas generales de producción, también establecen que el personal que labora en dichas áreas no debe ingresar a otras distintas a su sitio de trabajo.

De esta manera para controlar el antibiótico residual presente en áreas, equipo, ropa y utensilios, los laboratorios donde se producen dichos antibióticos llevan a cabo su inactivación por diferentes métodos, por ejemplo, empleando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Sin embargo el método más usado actualmente es a base de hipoclorito de sodio, debido a que representa una alternativa sencilla y económica comparada con los métodos ya mencionados.

Así con el fin de contribuir al control de las descargas de antibióticos en las aguas residuales provenientes del lavado de áreas, equipo, ropa y utensilios empleados en la fabricación de antibióticos β -lactámicos deberá realizarse la inactivación química de éstos. Dicha inactivación podrá efectuarse por ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o hipoclorito de sodio, dependiendo de las políticas, preferencias y características de cada industria que manufacture los antibióticos mencionados.

2. Definición y clasificación de antibióticos.

En vista de que éste trabajo trata de la inactivación de antibióticos es necesario comenzar por definir dicho término. A continuación se presenta la definición actual propuesta por Waksman en 1942 ⁽⁶⁾, en la cual define a los antibióticos como el producto del metabolismo microbiano capaz de producir muerte o inhibición del crecimiento de otros microorganismos, siendo éste efectivo a bajas concentraciones.

Actualmente existen una gran diversidad de antibióticos, diferentes en cuanto a su estructura química, propiedades y efecto sobre los microorganismos. Para facilitar el manejo químico y clínico de los mismos se les han clasificado de diferentes formas. Berdy ⁽⁶⁾ los clasifica de acuerdo a los siguientes criterios:

- Según su origen. Basado en la naturaleza de los microorganismos productores del antibiótico.

- Según su espectro de acción. Referido al número de microorganismos sobre los que actúa.

-Según su estructura. Estructura-efecto. Toma en cuenta la estructura química para lograr el efecto antibacteriano.

De los criterios anteriores el que tiene más importancia es el que clasifica a los antibióticos de acuerdo a su estructura química, esto debido a que es responsable de las propiedades farmacológicas y clínicas del antibiótico ^(8.7).

La clasificación de antibióticos de acuerdo a la estructura química se subclasifica en:

-Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana. Como es el caso de los antibióticos beta lactámicos.

-Antibióticos que modifican la permeabilidad de la membrana celular bacteriana.

-Antibióticos que inhiben principalmente la síntesis de proteínas por efecto sobre los ribosomas.

-Antibióticos que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos.

-Antibióticos que inhiben las rutas metabólicas. Esta última clasificación esta excluida por Berdy, pero es igualmente importante.

3. Antibióticos Beta-Lactámicos.

A continuación se presentan algunos aspectos importantes de los antibióticos que inhiben la síntesis de la membrana bacteriana como es el caso de los antibióticos beta lactámicos.

Debe comenzarse por definir el término beta-lactámico . Químicamente se denomina antibiótico beta-lactámico debido a que está formado por una amida cíclica, a las cuales se les denomina lactamas, la unión cíclica de la amida es en posición beta a un carbonilo justificando la denominación beta-lactámico, como se muestra en las estructuras generales de las figuras 1 y 2 respectivamente .

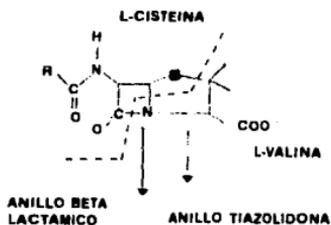


FIG. 1 Penicilina Estructura General.

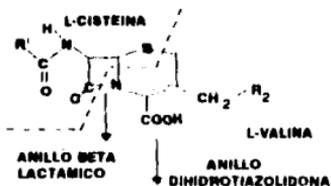


FIG. 2 Cefalosporina Estructura General

3.1 Mecanismo de Acción

En la última etapa de la formación de la pared celular bacteriana se lleva a cabo una transpeptidación ^(8,9,10), esta transpeptidación se ilustra en la figura 3 .

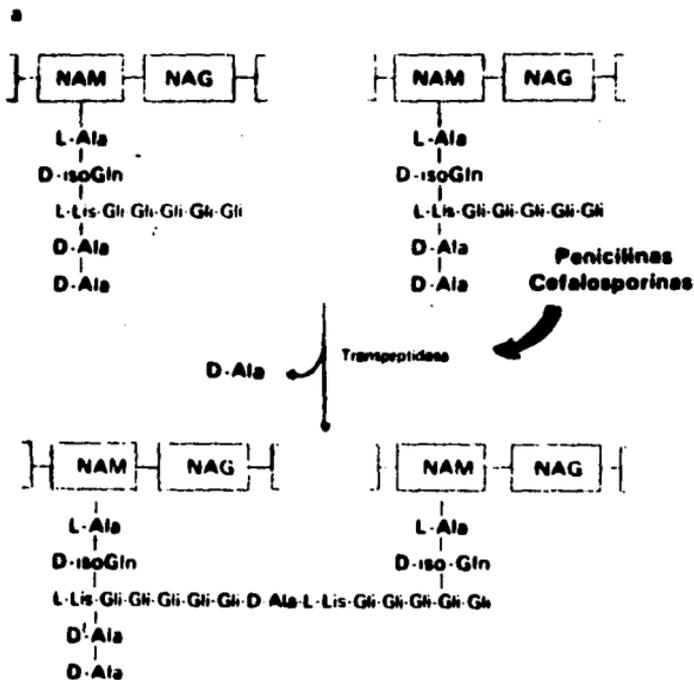


FIG. 3. a) Etapa final de la síntesis de la pared celular en *Staphylococcus aureus*.

b

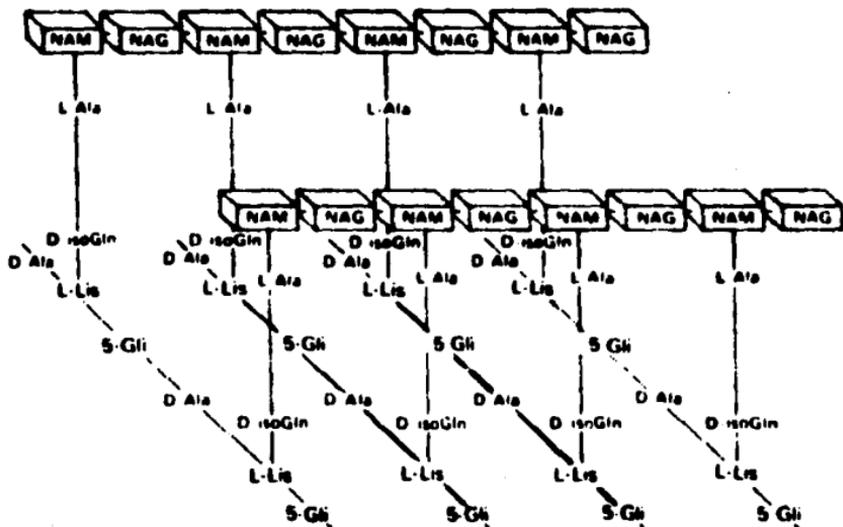


FIG. 3. b) Aspecto tridimensional de la estructura de parte de la pared celular terminada.

La transpeptidación consiste en una sustitución de una unidad del dipéptido D-alanina por una porción pentapeptídica de glicina como se aprecia en la figura anterior .

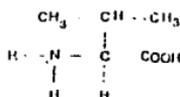
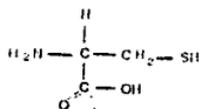
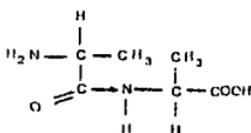
Las penicilinas y cefalosporinas están compuestas de L-cisteína y D-valina, semejante al dipéptido D-alanina. Esta semejanza se visualiza en las estructuras de la fig. 4 ^(7,9,10).

dipéptido

L-cisteína

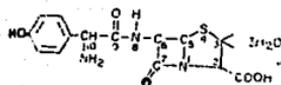
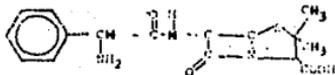
L-valina

D-alanina



Ampicilina

Amoxicilina



Cefizóx

Cefamezin

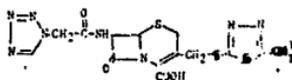
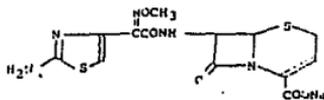


FIG. 4. Antibióticos y aminoácidos

Si se analizan las 7 estructuras anteriormente mostradas se concluirá que las penicilinas y cefalosporinas interfieren en la formación de la pared celular bacteriana, debido a que participan como un análogo del dipéptido D-alanina. Como ya se dijo anteriormente en la formación de la pared celular se lleva a cabo una transpeptidación de aminoácidos, de tal forma que, si están presentes los antibióticos no se llevará a cabo la transpeptidación, y por lo tanto, no se formará la pared celular en el microorganismo, quedando expuesto a las condiciones ambientales adversas.

3.2. Mecanismo de resistencia de microorganismos a los antibióticos beta-lactámicos.

El antibiótico ideal es el que tiene las siguientes características: estable en medios ácidos, resistente a las beta lactamas, tiene buena absorción, no produce reacciones alérgicas y tiene un amplio espectro bacteriano. Sin embargo, no existe hasta el momento un antibiótico que cumpla con todas estas características ^(8,9).

La resistencia de los microorganismos hacia los antibióticos hace que éstos se alejen de la idealidad ya descrita. Un microorganismo se considera "resistente", cuando es susceptible a concentraciones mayores a las que llega habitualmente un antibiótico a la sangre y otros tejidos del individuo.

En el caso contrario a la resistencia, un microorganismo sensible es aquel que resulta inhibido o destruido en concentraciones que alcanza el antibiótico en suero u otros tejidos.

De manera general existen dos tipos de resistencia⁽¹¹⁾.

-Resistencia Natural: Es la que ofrecen las bacterias de una sola especie hacia algún antibiótico, sin haber tenido previo contacto con el mismo.

-Resistencia Adquirida: Se desarrolla debido al contacto previo del antibiótico con el microorganismo. De esta forma el microorganismo adquiere material genético extracromosómico llevándose a cabo una mutación.

En la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos, el microorganismo sufre una mutación que da como resultado la síntesis de enzimas líticas.

De los dos grupos de antibióticos expuestos aquí, las penicilinas son las más sensibles a las enzimas líticas⁽¹²⁾. Las enzimas líticas más comúnmente sintetizadas por los microorganismos son la Beta lactamasas, aciclasas (amidases) y acetil estearasas.

Las beta lactamasas hidrolizan el anillo beta lactámico, con la producción de antibiótico inactivo (ácido peniciloico y cefalosporinoico). Las aciclasas hidrolizan el grupo N-acilo. La acetil estearasa es más específica ya que atrae selectivamente al C-3 del grupo acetil en las cefalosporinas^(4,10).

Para que todas las enzimas descritas anteriormente sean liberadas por el microorganismo es indispensable la presencia del antibiótico como sustrato.

La pérdida de la actividad biológica de los antibióticos beta lactámicos puede evaluarse por el consumo de yodo en una solución neutra de antibiótico, sin embargo este método es poco sensible⁽¹²⁾. Otra metodología, la cual se fundamenta en el fenómeno

de difusión, puede ser empleada para determinar la pérdida del anillo beta lactámico en los antibióticos (inactivación). En el método de difusión un medio de cultivo es inoculado con un microorganismo sensible al antibiótico, dicho microorganismo experimenta inhibición de su crecimiento en presencia del antibiótico. Así pues, el método de difusión puede ser empleado para evaluar la inactivación de los antibióticos beta lactámicos, siendo más sensible que el método en el que se emplea yodo.

Dado que en el presente trabajo se utilizó el método de difusión en placa para determinar la ruptura del anillo beta lactámico (inactivación), a continuación se presentan algunos aspectos teóricos importantes sobre la difusión.

La difusión, en un contexto general, puede definirse como el proceso mediante el cual existe movimiento de materia de un lugar a otro debido al movimiento azaroso de las moléculas. Matemáticamente es descrita por la ley de difusión de Fick's ^(13,14).

$$dm = -D a \frac{dc}{dx} dt$$

- Donde:
- D = Constante de proporcionalidad de difusión.
 - a = Area entre las concentraciones C1 y C2 dada por la difusión del antibiótico.
 - dc/dx = Gradiente de concentración.
 - dt = intervalo de tiempo.

El fenómeno de la difusión de antibióticos en una suspensión inoculada de agar se rige por la ley de difusión ya descrita. En la difusión del antibiótico ocurren los siguientes fenómenos.

a. El antibiótico difunde en la superficie del medio, produciéndose gradientes de concentración a medida que se difunde.

b. Al mismo tiempo el microorganismo metaboliza el antibiótico, después de haberse iniciado la fase "lag" (latencia) del crecimiento, después de esta etapa el microorganismo crece a velocidad logarítmica.

El resultado de los fenómenos ya descritos trae como resultado la inhibición en forma radial del crecimiento del microorganismo.

Para que se lleve a cabo la inhibición del crecimiento microbiano se requiere de una concentración y tiempo específico. En relación a estos dos aspectos se definen los siguientes conceptos.

Concentración crítica. Es la concentración a la cual el microorganismo empieza a ser sensible al antibiótico produciéndose una zona de inhibición. Matemáticamente este concepto se define como:

$$\ln m' = \ln m_0 - X^2 / 4 D T_0$$

Donde: **D** = Coeficiente de difusión.

T_o = Tiempo crítico.

Ln m_o = Logaritmo natural de la concentración de antibiótico en el reservorio.

X² = El cuadrado de la distancia existente desde el punto de aplicación hasta el borde donde termina la zona de inhibición.

Tiempo crítico. Es el tiempo necesario para que se manifieste la concentración crítica, o bien el tiempo mediante el cual se da la inhibición de la densidad del crecimiento.

Matemáticamente se define como:

$$T_o \cdot h = X^2 / 4D \text{ Ln } (m_o/m')$$

Donde: **D** = Coeficiente de difusión.

T_o = Tiempo crítico.

h = horas de preincubación.

X² = El cuadrado de la distancia existente desde el punto de aplicación hasta el borde donde termina la zona de inhibición.

m' = Concentración del antibiótico al tiempo crítico.

m_o = Concentración del antibiótico en el reservorio .

El tiempo crítico es independiente de la concentración de antibiótico en el reservorio.

Factores que afectan las zonas de inhibición: A continuación se presentan los factores que afectan las zona de inhibición.

a. Condiciones del microorganismo de prueba, forma vegetativa o esporulada.

b. Elección del microorganismo de prueba, se refiere a la sensibilidad del microorganismo de prueba al antibiótico.

c. Densidad del inóculo. Es el factor más importante debido a que determina el tamaño de las zonas de inhibición. La densidad del inóculo tiene una relación inversa con las zonas de inhibición.

d. Formulación y condiciones del medio. La composición puede tener efecto sobre la actividad del antibiótico, así como difusión del mismo y puede afectar el crecimiento del microorganismo.

e. El espesor del medio inoculado en la capa de agar puede incrementar o disminuir las zonas de inhibición.

f. Potencia de la solución de prueba.

g. El área cubierta por el papel o cilindro.

h. Tiempo de aplicación de la solución de prueba.

i. Temperatura de incubación. Puede aumentar o disminuir las zonas de inhibición.

3.3. Estabilidad química del anillo beta-lactámico ante bases.

Como se mencionó anteriormente, lo que determina la actividad biológica de los antibióticos beta-lactámicos, es el anillo del mismo nombre, el cual forma parte de su estructura química. Es importante discutir algunos aspectos sobresalientes de la estabilidad del anillo beta lactámico ante bases.

Los dos grupos de antibióticos beta-lactámicos importantes son: las penicilinas y cefalosporinas. En la estructura general de las penicilinas y cefalosporinas el anillo beta-lactámico se une a otro anillo llamado tiazólico y dihidrotiazólico, respectivamente. La unión que forma el anillo beta-lactámico es de carácter bipolar, esto lo hace muy susceptible a reaccionar con nucleófilos y electrófilos ⁽¹¹⁵⁾. La conjugación con los anillos de tiazolidona y dihidrotiazolidona hace más reactivo al beta-lactámico debido a que disminuye la forma resonante B con respecto a la forma resonante A (figura 5), esto hace al carbonilo beta lactámico semejante a un éster presentándose la hidrólisis del mismo ante nucleófilos y electrófilos ^(112,116).

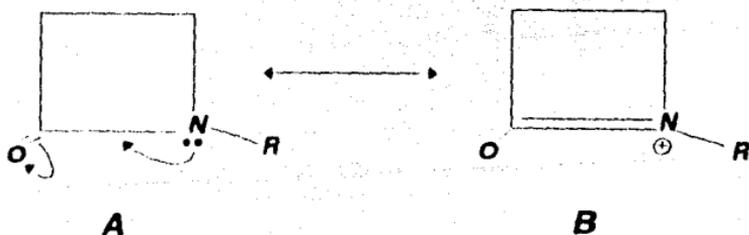
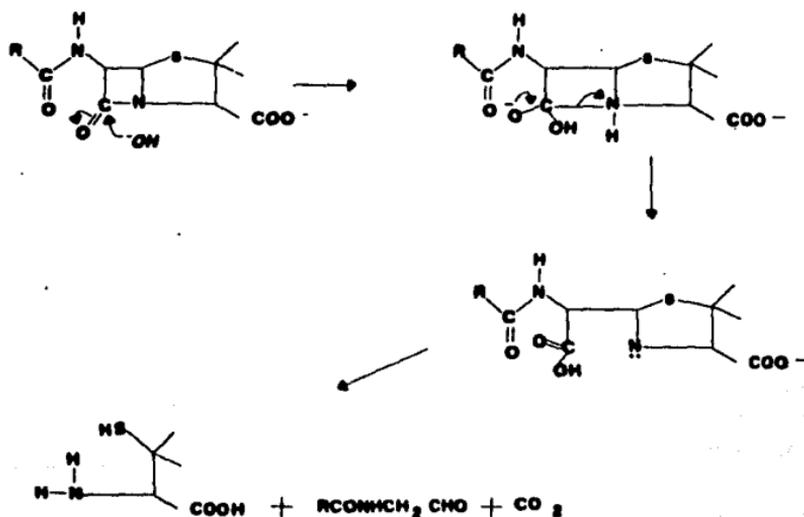


FIGURA 5. Estructuras resonantes

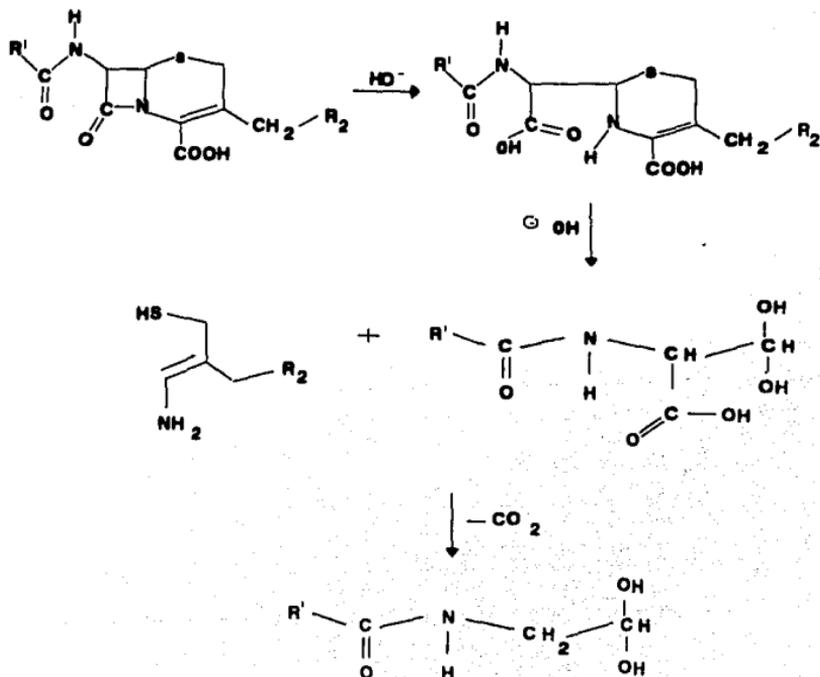
El producto inicial en la degradación ante bases y agentes oxidantes es el ácido peniciloico biológicamente inactivo ^(10,12,16).

A continuación se presentan los mecanismos de reacción propuestos por Hou Poole y Namiky et al para penicilinas y cefalosporinas respectivamente, en medio básico ⁽¹⁰⁾.

ESQUEMA DEL MECANISMO DE DEGRADACION DE LAS PENICILINAS EN MEDIO BASICO.



ESQUEMA DEL MECANISMO DE DEGRADACION DE CEFALOSPORINAS EN MEDIO BASICO.



4. Métodos de cilindro placa para cuantificación de antibióticos.

Existen 3 métodos de cilindro placa para determinación de potencia a los antibióticos, dichos métodos son: bloques desbalanceados, bloques balanceados y cuadro latino^(4,17).

De los tres métodos mencionados el más utilizado es el de bloques desbalanceados siempre y cuando se quiera determinar una sola muestra. Este método maneja rangos de concentración de 60 a 150 %, por lo que una muestra a analizar difícilmente se sale de estos límites.

El método de bloques desbalanceados maneja una curva de calibración de 5 dosis y la interpolación de un punto que corresponde a la muestra, por esta característica es denominada también cinco más uno.

Las características del método de bloques desbalanceados son:

a) Se tiene un total de 6 tratamientos, 5 niveles de dosis del patrón, igualmente espaciados en escala logarítmica y un nivel de dosis de muestra, equivalente en forma estimativa a la dosis intermedia del patrón.

b) Se utilizan un total de 15 cajas petri divididas en 5 grupos de 3 cajas cada uno.

c) A cada caja del grupo se le asigna por triplicado la dosis intermedia del patrón y la dosis del nivel correspondiente, repitiéndose esto mismo para la muestra.

d) Las replicaciones de los tratamientos en cada caja se distribuyen en forma alternada.

Antes de llevar cabo el método de bloques desbalanceados 5 + 1 es indispensable realizar un tratamiento estadístico a través de un análisis de varianza que determine las desviaciones del efecto lineal del logaritmo de la dosis sobre la respuesta.

Propiamente para los objetivos de este trabajo lo que se busca no es tanto la cuantificación de la potencia del antibiótico, si no la pérdida de la misma, por lo que pudiera decirse que el término potencia de antibióticos no es aplicable en el método, sin embargo, se denominó de esta manera debido a que así se conoce en las referencias oficiales como es el caso de CFR y las diferentes farmacopeas existentes en México.

5. Métodos de inactivación.

Como ya se mencionó el anillo β -lactámico es susceptible de ser degradado por nucleófilos y electrófilos como lo determinan los estudios realizados por Finholt y colaboradores en la degradación de penicilina G en medio ácido, neutro y alcalino⁽¹⁸⁾. Así la degradación de los antibióticos beta lactámicos ante bases y ácidos se aprovecha en la industria farmacéutica para eliminar el antibiótico residual presente en áreas, equipo, ropa y utensilios.

Por lo que se puede decir que existen dos métodos para la inactivación de antibióticos en la industria farmacéutica los cuales son:

1. Inactivación con hidróxido de sodio
2. Inactivación con ácido clorhídrico.

Estos métodos tienen la desventaja de requerir tres pasos en su realización los cuales son: inactivación, neutralización y lavado, lo que los hace largos y costosos. Ante estas desventajas, en los últimos 10 años se está empleando el hipoclorito de sodio como agente inactivante debido a que se utiliza a bajas concentraciones con resultados efectivos en cuanto a la inactivación¹⁵¹; la ventaja de este método es que no se práctica una neutralización por lo que es más económico y sencillo.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los antibióticos son medicamentos que se utilizan para aliviar diferentes padecimientos infecciosos. En particular, los antibióticos beta-lactámicos son empleados para aliviar los padecimientos broncorespiratorios. Así, cuando estos antibióticos no se emplean en las dosis adecuadas, los microorganismos causantes de las infecciones adquieren resistencia a los mismos, lo cual constituye un problema de salud debido a que las enfermedades infecciosas quedan fuera de control.

Con el fin de evitar el desarrollo de resistencia de los microorganismos hacia los antibióticos, las Buenas Prácticas de Manufactura establecen que los antibióticos β -lactámicos deben ser inactivados de áreas, equipos, ropa y utensilios o bien de las aguas residuales que se generen del lavado de estos. Los métodos tradicionales de inactivación en la industria farmacéutica son a base de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, dichos métodos tienen la desventaja de llevarse a cabo en tres pasos por lo que el proceso de inactivación se hace largo y costoso. En los últimos años se está empleando el hipoclorito de sodio, el cual es un agente barato y de manejo sencillo en comparación con los agentes tradicionales.

Por lo anterior, en un laboratorio farmacéutico se empleará el hipoclorito de sodio para destruir la actividad biológica de ampicilina, amoxicilina, cefizox y cefamezin, antibióticos beta-lactámicos, descargados y almacenados en una cisterna de tratamiento de aguas residuales, para lo cual es indispensable desarrollar técnicas de cuantificación e inactivación de los antibióticos contenidos en dichas aguas, ya que hasta el momento no se cuenta con ellas.

III. OBJETIVO

IV. OBJETIVO.

OBJETIVO GENERAL. Inactivación de la actividad microbiológica de antibióticos Beta-Lactámicos en aguas residuales provenientes de una planta farmacéutica, utilizando hipoclorito de sodio como agente inactivante, en un sistema de 3 cisternas de almacenamiento y tratamiento de agua residual.

1.OBJETIVOS PARTICULARES.

1.1. Determinar las condiciones óptimas de inactivación de antibióticos Beta-Lactámicos.

1.2. Evaluar y adecuar la técnica de potencia microbiológica para ampicilina, en la determinación de la inactivación biológica de ampicilina, amoxicilina, cefizóx y cefamezin con hipoclorito de sodio.

1.3. Evaluar la inactivación de ampicilina, amoxicilina, cefizóx y cefamezin en una muestra de agua residual de una compañía farmacéutica que produce estos antibióticos. Se utilizará la técnica optimizada de potencia microbiológica para ampicilina.

1.4. Desarrollar una metodología que permita cuantificar y neutralizar el hipoclorito de sodio residual después de haber llevado a cabo el proceso de inactivación, logrando

eliminar el efecto bactericida del hipoclorito en la técnica microbiológica.

1.5. Diseñar y optimizar un sistema automatizado de tratamiento de antibióticos Beta-Lactámicos contenidos y almacenados en tres cisternas de tratamiento de agua residual, utilizando hipoclorito de sodio y evaluando la inactivación con la técnica de potencia microbiológica para antibióticos.

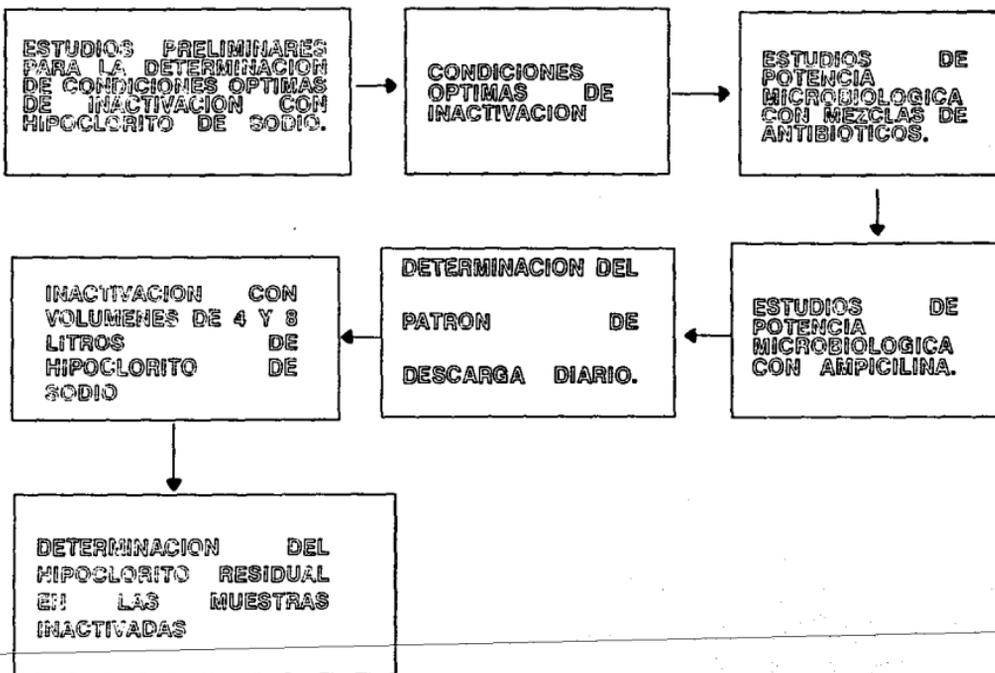
IV. HIPOTESIS

IV. HIPOTESIS.

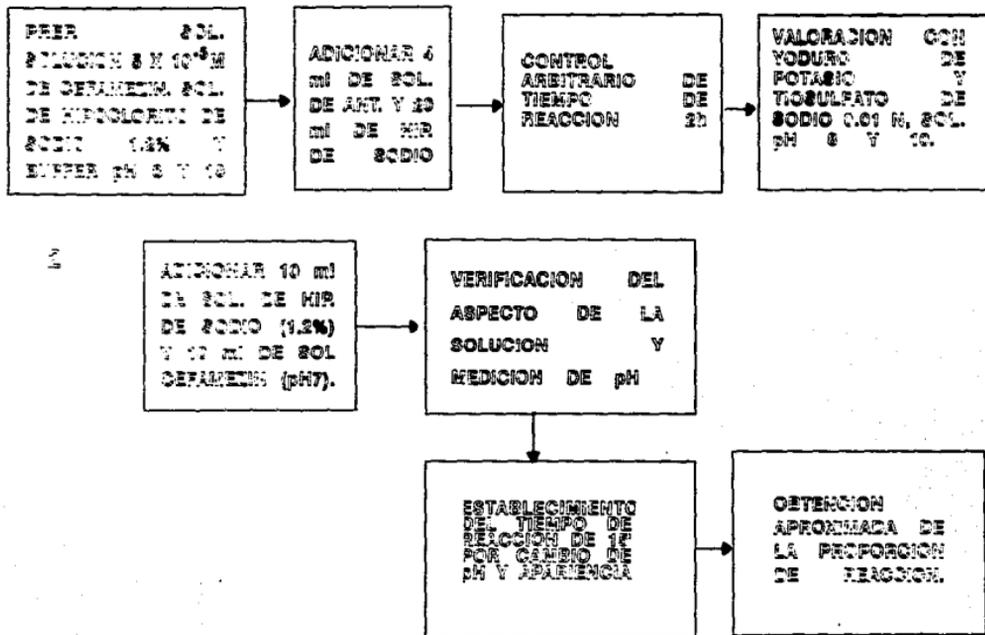
El hipoclorito de sodio ha sido empleado a una concentración del 1.22 % para inactivar los antibióticos beta lactámicos, por lo que si se emplea al 2 % será capaz de inactivar el anillo Beta-Lactámico de amoxicilina, ampicilina cefizóx y cefamezin contenidos en las aguas residuales de una planta farmacéutica.

1.CONDICIONES OPTIMAS DE INACTIVACION

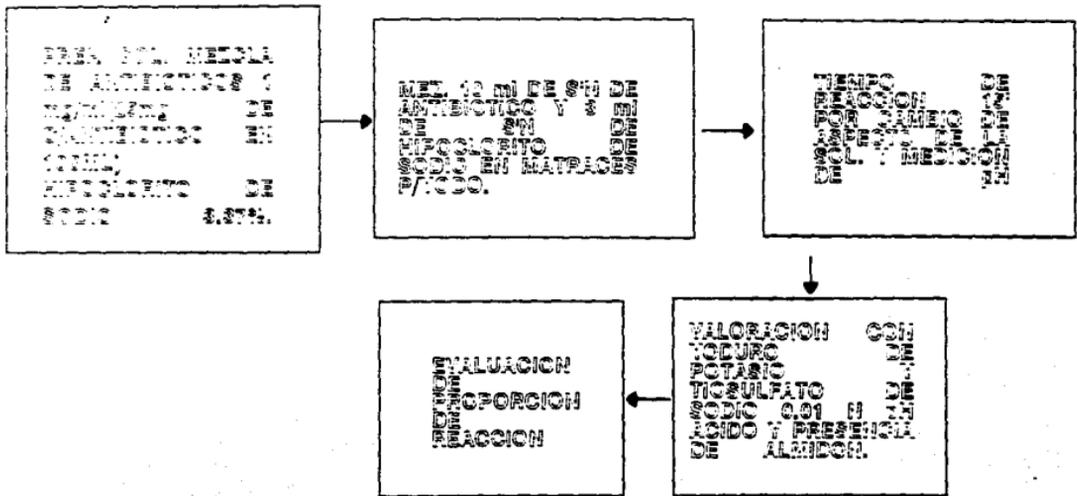
ESQUEMA 1. METODOLOGIAS GENERALES



ESQUEMA 2. CONDICIONES DE OPTIMAS DE INACTIVACION CON HIPOCLORITO DE SODIO (PRELIMINARES)



ESQUEMA 3. CONDICIONES OPTIMAS DE INACTIVACION CON HIPOCLORITO DE SODIO.



V. MATERIALES Y METODOS

V. MATERIALES Y METODOS.

1.CONDICIONES OPTIMAS DE INACTIVACION DE ANTIBIOTICOS BETA LACTAMICOS.

Para llegar a la metodología de condiciones óptimas de inactivación de antibióticos, se realizaron varios estudios previos, los cuales se resumen a continuación.

Se trabajaron varias muestras de 4 ml de una solución de cefamezin a una concentración de 5×10^{-3} M, este antibiótico fue elegido al azar de los 4 fabricados por la compañía en donde se efectuó este trabajo . Dichas muestras se trabajaron a dos pHs , pH 8 con solución reguladora de fosfatos y pH 10 con solución buffer comercial (Merck) de ácido bórico-cloruro de potasio-hidróxido de sodio.

A las muestras con diferentes pHs se les adicionó 20 ml de una solución de hipoclorito de sodio al 1.22% . Al adicionar el hipoclorito de sodio a las soluciones de antibiótico estas cambiaron de color y el pH se incremento de neutro a alcalino. Estos cambios físico-químicos tienen una permanencia de 10 minutos, por lo que se estimó bajo estas condiciones un tiempo de reacción de 15 minutos, mismo que se controló en los estudios subsecuentes. A las muestras que se experimentaron bajo estas condiciones no fue posible determinarles el hipoclorito de sodio en exceso.

Se trabajo otra muestra a pH 7 , con una mezcla de 10 ml de solución de cefamezin a la misma concentración que se utilizó inicialmente y 10 ml de solución de hipoclorito de sodio al 1.22%. En éste estudio se corroboró el cambio de color de la solución y el cambio de pH al adicionar el hipoclorito de sodio a la solución de antibiótico. Al igual

que en estudio con soluciones a diferentes pHs se detectó un tiempo de reacción de 10 minutos, y en este caso si se cuantificó el hipoclorito de sodio en exceso.

A partir del estudio en el cual se utilizaron los mismos volúmenes de solución de antibiótico e hipoclorito de sodio se realizaron otros estudios pero empleando soluciones con mezclas de antibióticos. De los estudios con mezclas se determinaron las condiciones óptimas de inactivación. La técnica desarrollada se presenta a continuación

MATERIAL.

6 Matraces para yodo de 250 ml marca Pyrex

2 Matraces aforados de 100 ml

1 Pipeta volumétrica 10 ml

1 Pipeta volumétrica 1 ml

1 Pipeta volumétrica 3 ml

1 Bureta de 25 ml

1 Bureta de 50 ml

6 Magnetos para agitación.

1 Pinzas para bureta.

1 Soporte universal.

EQUIPO

Parrilla de agitación.

Balanza analítica marca Mettler modelo AE-150.

REACTIVOS

1. Solución de antibióticos. Cefamezin, cefizóx, ampicilina y amoxicilina.
2. Solución de hipoclorito de sodio al 3.37 % (v/v).
3. Yoduro de Potasio marca Merck.
4. Solución de ácido acético 6 N.
5. Solución de almidón.
6. Solución comercial valorada de tiosulfato de sodio 0.1N marca Merck.

PREPARACION DE SOLUCIONES.

1. Solución de antibióticos. Pesar 25 mg de cada uno de los siguientes antibióticos:

Cefizóx: Frasco vial inyectable de 1g (Promeco).

Cefamezin: Frasco vial inyectable de 1g (Promeco).

Ampicilina sódica (materia prima).

Amoxicilina estándar secundario.

Depositarlos en un matraz aforado de 100 ml, disolver y llevar al aforo con agua destilada.

2. Solución de hipoclorito de sodio al 3.37 % (v/v). Tomar con bureta 32 ml de solución comercial de hipoclorito de sodio al 11.7 % y aforar a 100 ml.

3. Yoduro de Potasio marca Merck.

4.Solución de ácido acético 6 N. En un matraz aforado de 500 ml, que contenga aproximadamente 200 ml de agua destilada, adicionar 172.1 ml de ácido acético glacial marca Merck, mezclar y aforar con agua destilada.

5.Solución de almidón. Mezclar 1g de almidón soluble con 10 mg de yoduro de mercurio rojo y suficiente agua tibia hasta formar una pasta. Adicionar 200 ml de agua hirviendo y poner la suspensión en ebullición por 1 min. con agitación constante. Dejar enfriar y utilizar únicamente la solución clara.

6.Solución comercial valorada de tiosulfato de sodio 0.1N marca Merck. Resultado valoración control de calidad Promeco 0.101 N.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

1.Depositar con pipeta volumétrica 10 ml de solución de antibióticos en cuatro matraces para yodo.

2.A cada matraz adicionar 3 ml de solución de hipoclorito de sodio al 3 .37 % (v/v).

3. A un quinto matraz adicionar 10 ml de agua destilada y 3 ml de solución de hipoclorito de sodio al 3.37 % (v/v). Este último matraz es utilizado para determinar el contenido total de hipoclorito de sodio contenido en la solución empleada.

4.Agitar los matraces por un período de 15 minutos.

5. Pesar con exactitud en la balanza analítica 1g de yoduro de potasio y añadirlos a cada uno de los cinco matraces.

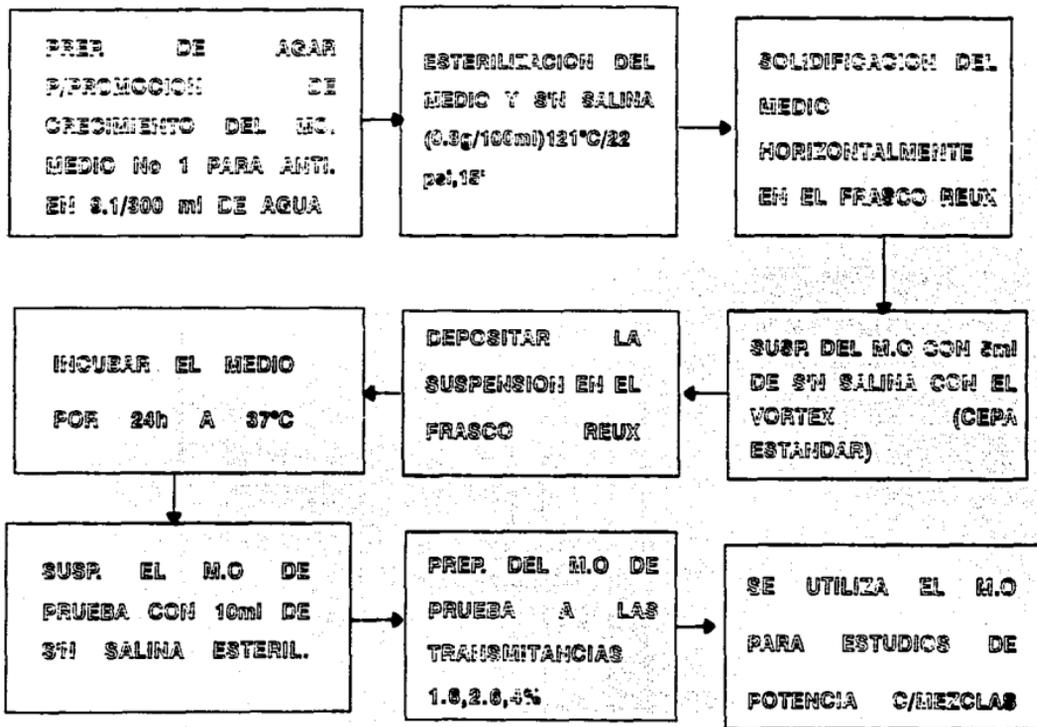
6. Agregar a cada uno de los matraces 10 ml de solución de ácido acético 6 N. Cuidar que los matraces estén perfectamente cerrados y controlar el tiempo de reacción en 5 min .

7. A los 5 minutos de reacción en medio ácido, agregar a cada matraz 1.5 ml de solución indicadora de almidón.

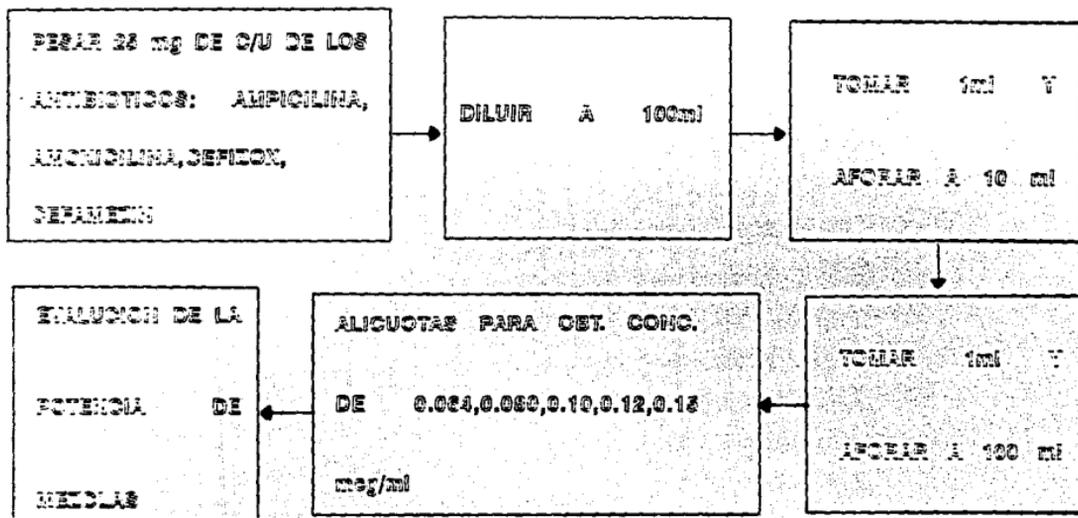
8. Valorar la solución del paso 7 con tiosulfato de sodio 0.1 N . El punto final de reacción se detecta cuando se observa un cambio de color en la solución que pasa de azul a incoloro.

2. ESTUDIOS DE POTENCIA MICROBIOLÓGICA CON MEZCLAS

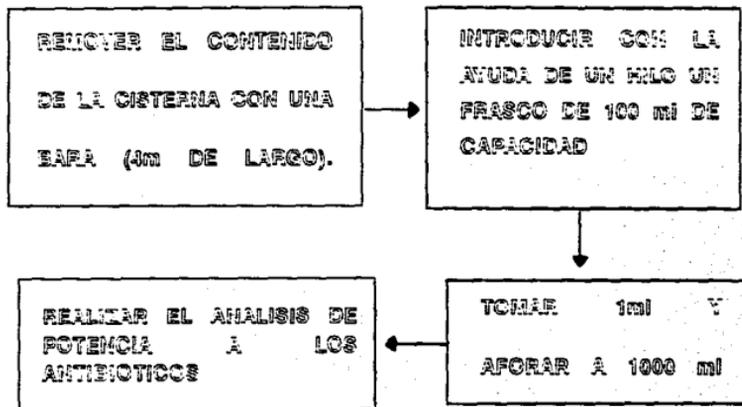
ESQUEMA 4. PREPARACION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA PARA MEZCLAS.



**ESQUEMA 5. PREPARACION DE CURVAS
TIPO PARA MEZCLAS.**

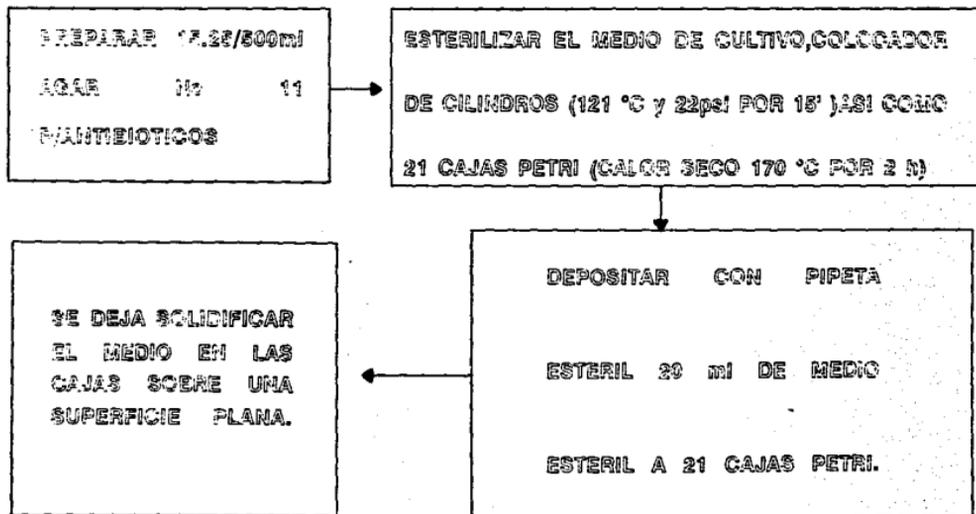


ESQUEMA 6. PREPARACION Y TOMA DE MUESTRAS PARA MEZCLAS.



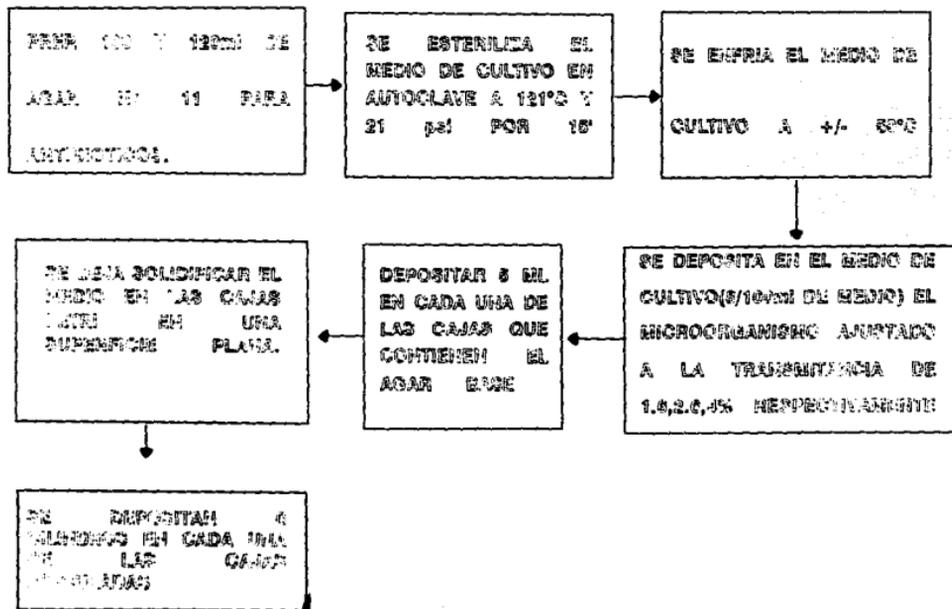
**ESQUEMA 7.
BASE**

**PREPARACION DEL AGAR
PARA MEZCLAS.**

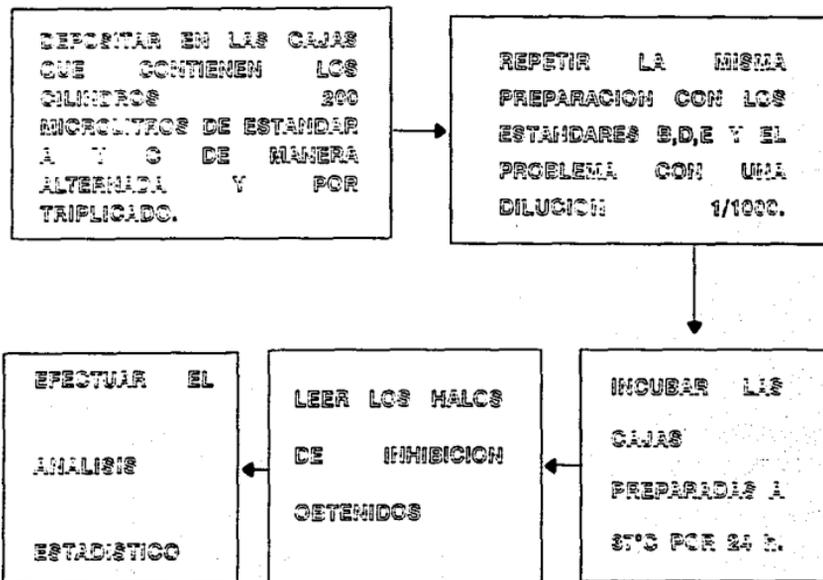


**ESQUEMA 8.
INOCULO**

**PREPARACION DEL AGAR
PARA
MEZCLAS.**



ESQUEMA 9. PREPARACION Y ANALISIS DE MUESTRAS PARA MEZCLAS.



2. ESTUDIO DE POTENCIA MICROBIOLÓGICA CON MEZCLAS DE ANTIBIÓTICOS.

MATERIAL.

Frasco Reux

Matraz erlenmeyer de 100 ml

Matraz erlenmeyer estéril de 250 ml

Pipeta estéril de 5 ml

REACTIVOS.

Cloruro de sodio

Medio número 1 para antibióticos marca Merck

EQUIPO.

Autoclave a presión de 22 psi y 121 °C

Incubadora a 37 °C

Balanza marca Mettler con exactitud de 0.001 g

Vortex.

2.1 Preparación del microorganismo de prueba (S. LUTEA ATCC 9341)

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

1. Pesar 9.1 g de medio No 1 para antibióticos y dispersar en un frasco Reux que contenga aproximadamente 150 ml de agua destilada, agitar y dispersar el medio de cultivo en este volumen, adicionar volúmenes de 50 ml hasta completar 300 ml. Cuidar que el medio de cultivo se disuelva completamente.

2. Esterilizar el medio preparado a una temperatura de 121 °C y 22 psi de presión, durante 15 min.

3. Una vez esterilizado el medio del paso 2 se deja solidificar en el frasco Reux en forma horizontal.

4. Preparar la solución salina isotónica, disolviendo 0.85 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada. Esterilizar bajo las mismas condiciones del medio número 1.

5. Tomar un tubo que contenga siembra reciente de *S. lutea*, suspender el microorganismo desarrollado en 5 ml de solución salina estéril haciendo uso del vortex.

6. Depositar y dispersar la suspensión obtenida en el paso 5 sobre la superficie del agar contenido en el frasco Reux.

7. Incubar el medio inoculado del frasco Reux a una temperatura de 37 °C por 24 h.

8. Extraer el crecimiento desarrollado con un volumen de 10-15 ml de solución salina estéril.

9. Preparar las siguientes suspensiones a partir del inóculo obtenido en paso 8. Transmitancias 1.2 %, 2.6%, 4.0%. Para obtener estas transmitancias tomar 1.2 ml de la suspensión resultante del punto 8 (suspensión stock) y depositarlos en una celda para espectrofotómetro de 1 cm², diluir en la misma celda con 1.8 ml de solución salina estéril, agitar la celda auxiliándose de papel parafilm. Leer la transmitancia obtenida a 580 nm. Si la transmitancia no es la especificada diluir la suspensión stock con la solución salina estéril y leer nuevamente en la celda como ya se indicó. Hacer las diluciones necesarias para obtener las transmitancias especificadas.

NOTA: Utilizar un blanco de solución salina para hacer el ajuste a 100 % de transmitancia.

2.2. Preparación de soluciones para curva estándar.

MATERIAL.

21 Cajas petri de vidrio de 10 cm de diámetro.

Cilindros de acero inoxidable con diámetro exterior de 8 mm +/- 0.1 mm y diámetro interior de 6 mm +/- 0.1 mm con longitud de 10 mm.

Matraces volumétricos de 1000, 500, 100, 50, 25, y 10 ml.

Bureta de 25 ml.

Pipetas volumétricas de 1, 2 y 5 ml.

2 Pipetas graduadas estériles de 25 ml.

Termómetro de 0-100 °C .

Micropipetas para dosificar 200 microlitros.

Cultivo reciente en tubo de *S. aurea* ATCC 9341.

REACTIVOS.

Medio No 11 para antibióticos marca Merck.

Sal de fosfato dibásico de potasio.

Sal de fosfato monobásico de potasio.

EQUIPO.

Autoclave a 121 °C y 22 psi de presión.

Colocador de cilindros marca Craft.

Medidor de halos de inhibición marca Fisher Lily.

Incubadora a 37 °C.

Balanza marca Mettler con exactitud de 0.0001 g.

Desarrollo experimental.

-Preparación curva tipo.

- 1. Preparar 2 litros de solución buffer pH 8, disolviendo 33.46 g de fosfato dibásico de potasio y 1.04 g de fosfato monobásico de potasio, en 500 ml de agua destilada, llevar al aforo.**

2. Preparar las siguientes soluciones, que se utilizan para establecer las curvas tipo de concentración para mezclas de antibióticos.

a) Pesar 25 mg de cada uno de los siguientes antibióticos: ampicilina, amoxicilina, cefamezin y cefizón .

b) Disolver los cuatro antibióticos en un matraz volumétrico de 100 ml y aforar con agua destilada .

c) Tomar una alícuota de 1 ml y diluirla en un matraz volumétrico de 10 ml con solución buffer pH 8 .

d) Tomar una alícuota de 1 ml y diluir a 100 ml, en un matraz volumétrico, con solución buffer pH 8.

e) Con esta última solución se elabora la siguiente curva tipo.

| Punto | Alícuota tomada (ml) | Aforo buffer pH 8 | Concentración (mcg/ml) |
|--------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| A | 1.6 | 25 | 0.064 |
| B | 2.0 | 25 | 0.080 |
| C | 5.0 | 50 | 0.100 |
| D | 6.3 | 50 | 0.126 |
| E | 7.8 | 50 | 0.156 |

2.3 Preparación y toma de muestras.

- 1. Remover el contenido del depósito que colecta el agua descargada por la planta de antibióticos , con la ayuda de una vara larga de aproximadamente 4 m de largo.**
- 2. Introducir un frasco con capacidad para 100 ml a la cisterna y tomar la muestra de agua residual.**
- 3. Tomar con pipeta volumétrica 1 ml de muestra y diluirla en un matraz aforado de 1000 ml con agua destilada. Esta es la solución problema a la cual se le determinará el contenido de antibiótico activo.**

2.4 Preparación de agar base y agar inóculo para evaluar la potencia microbiológica.

-Agar Base.

- 1. Pesar 15.25g de medio de cultivo número 11 para antibióticos, disolver y dispersar en diferentes proporciones de agua destilada hasta completar un volumen de 500 ml.**
- 2. Esterilizar el medio de cultivo en autoclave a 121 °C y 22 psi de presión por 15 min.**
- 3. Con pipeta estéril de 25 ml depositar 20 ml del medio esterilizado en el paso 2, en cada una de las 21 cajas petri (esterilizadas previamente por calor seco a 170 °C por dos horas).**

4. Solidificar el medio en las cajas petri.

-Agar Semilla o inóculo.

1. Pesar 2.1 y 2.52g de medio número 11 para antibióticos dispersar y disolver en 100 y 120 ml de agua destilada, respectivamente.

2. Esterilizar los medios de cultivo a 121 °C y 22 psi de presión por 15 min.

3. Depositar 8 ml de suspensión del microorganismo preparada en el procedimiento 3.1 (transmitancia 1.2%) estando el agar del paso 2 a 50 °C +/- 1 °C .

4. Con pipeta estéril depositar 5 ml de agar inoculado del paso 3, a cada una de las 21 cajas que contienen el agar base y homogenizar esta capa realizando movimientos en forma de ocho al depositar el inóculo.

5. Dejar solidificar el agar depositado en las cajas.

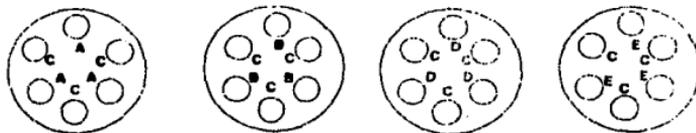
6. Depositar en cada una de las cajas 6 cilindros (previamente esterilizados) utilizando el colocador de cilindros.

7. Los pasos 3,4,5 y 6 se repetiran para las suspensiones del procedimiento 2.1 ajustadas a una transmitancia del 2.6 y 4 %.

-Preparación de cajas con estándares y muestras de la cisterna.

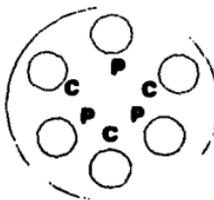
Dosificar con una micropipeta 200 microlitros de soluciones con concentración estándar A,B,C,D y E en cada uno de los cilindros depositados en las cajas petri de la siguiente manera:

1. Depositar en tres cajas de forma alternada solución que corresponde a la concentración del punto "A" y solución a la concentración "C", tal como se muestra en el siguiente esquema.



2. Hacer lo mismo con las soluciones de los puntos B,D y E .

3. Depositar de manera alternada la solución problema y la solución de concentración "C" de acuerdo al siguiente esquema.



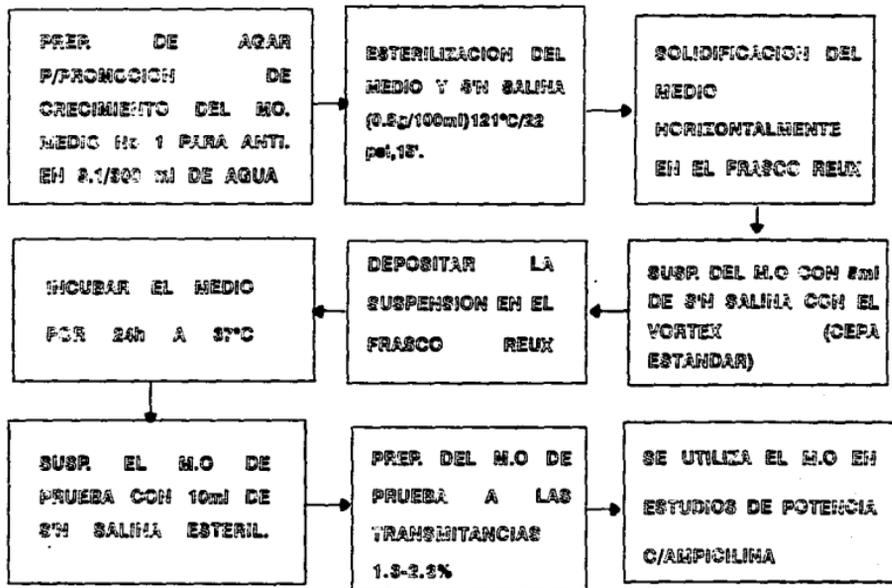
4. Las cajas se incuban por 24 horas a 37 °C.

5. Leer los halos de inhibición con ayuda del lector.

6. Repetir los pasos 1,2,3,4 y 5 con las cajas preparadas con microorganismos al 2.6 y 4%.

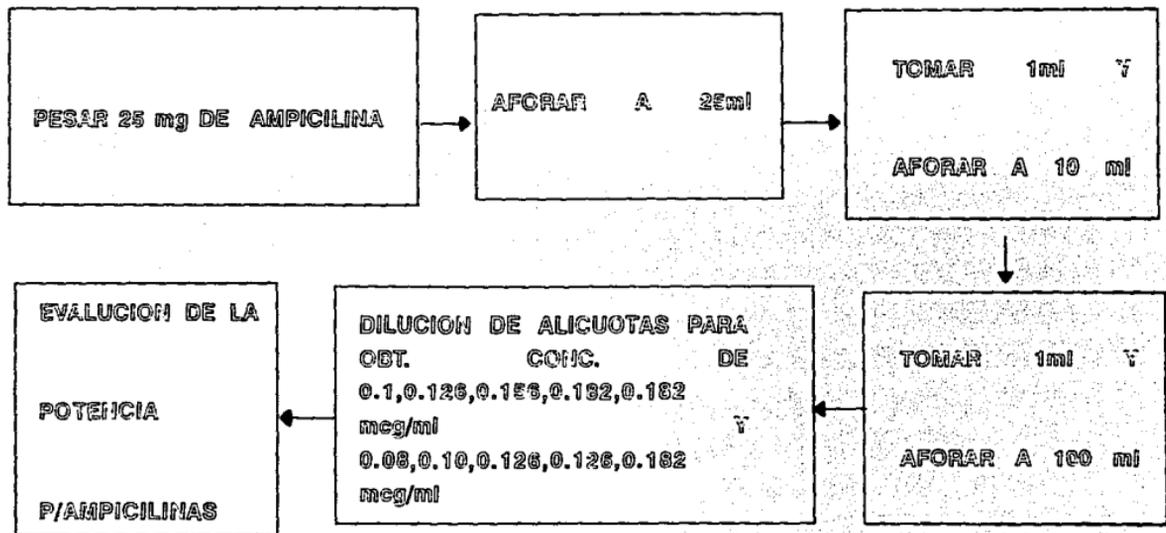
3. ESTUDIOS DE POTENCIA MICROBIOLOGICA PARA AMPICILINA

ESQUEMA 10. PREPARACION DEL MICROORGANISMO DE PRUEBA PARA AMPICILINA.

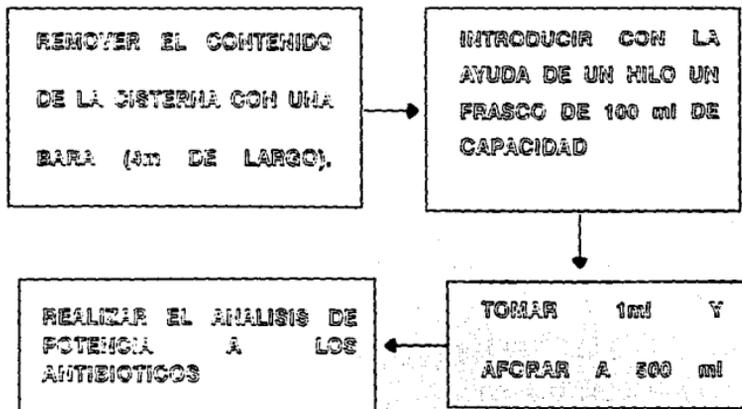


**ESQUEMA 11.
TIPO**

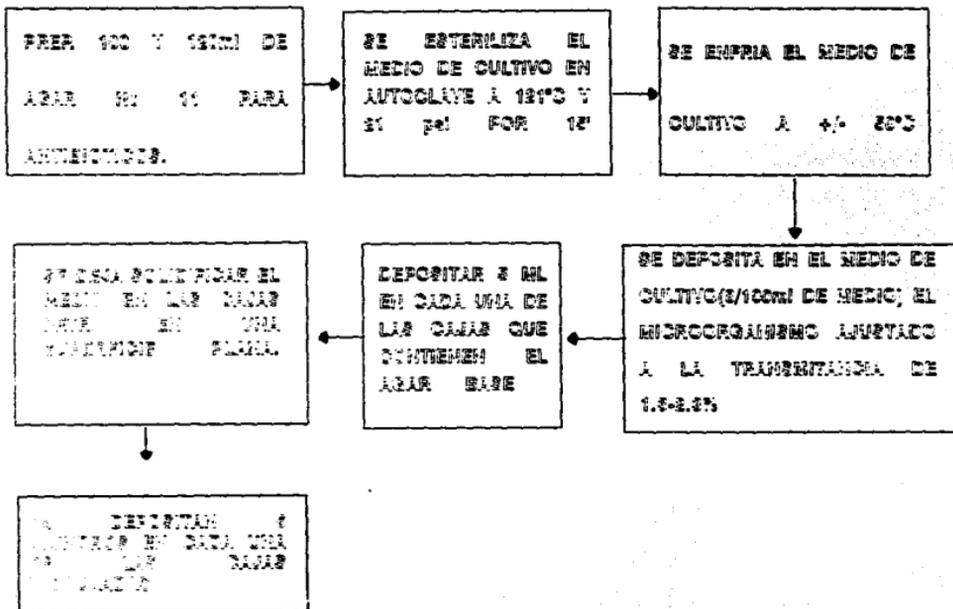
**PREPARACION DE CURVAS
PARA
AMPICILINA**



ESQUEMA 12. PREPARACION Y TOMA DE MUESTRAS PARA AMPICILINA.

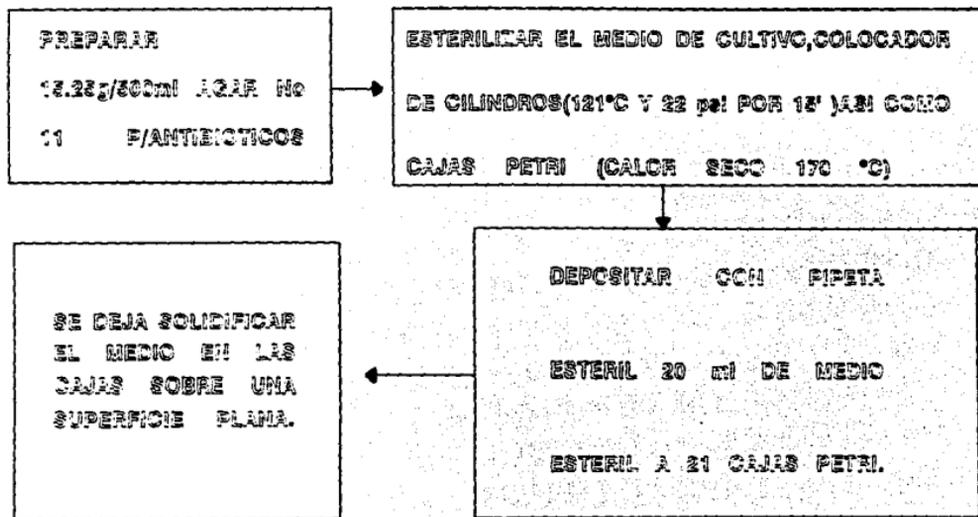


ESQUEMA 13. PREPARACION DEL AGAR INOCULO (PARA ESTUDIOS CON AMPICILINA)

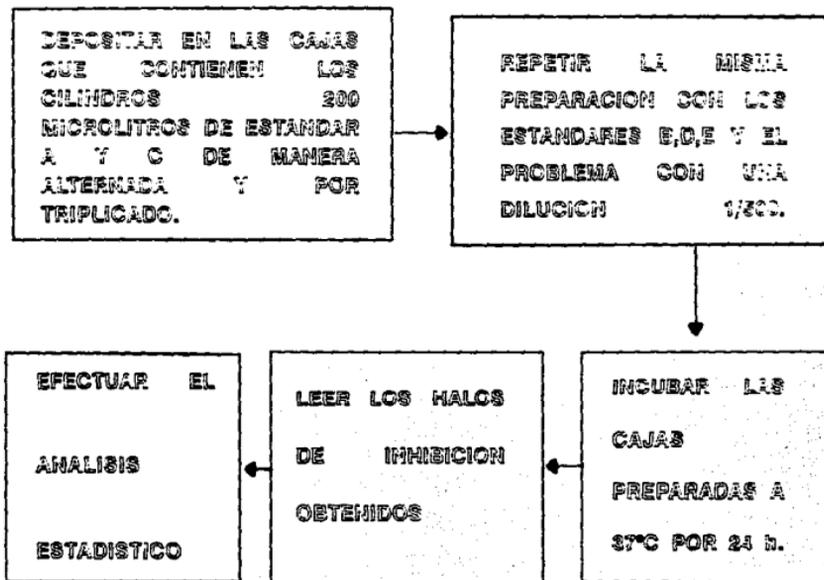


**ESQUEMA 14.
BASE**

**PREPARACION DE AGAR
PARA AMPICILINA.**



ESQUEMA 15. PREPARACION Y TOMA DE MUESTRAS PARA AMPICILINA.



3.ESTUDIOS DE POTENCIA MICROBIOLÓGICA PARA AMPICILINA.

MATERIAL.

Frasco Reux

Matraz erlenmeyer de 100 ml

Matraz erlenmeyer estéril de 250 ml

Pipeta estéril de 5 ml

REACTIVOS.

Cloruro de sodio

Medio número 1 para antibióticos marca Merck

EQUIPO.

Autoclave a presión de 22 psi y 121 °C

Incubadora a 37 °C

Balanza marca Mettler con exactitud de 0.001 g

Vortex.

3.1 Preparación del microorganismo de prueba (S. LUTEA ATCC 9341)

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

1. Pesar 9.1 g de medio No 1 para antibióticos y dispersar en un frasco Reux que contenga aproximadamente 150 ml de agua destilada, agitar y dispersar el medio de cultivo en este volumen, adicionar volúmenes de 50 ml hasta completar 300 ml. Cuidar que el medio de cultivo se disuelva completamente.

2. Esterilizar el medio preparado a una temperatura de 121 °C y 22 psi de presión, durante 15 min.

3. Una vez esterilizado el medio del paso 2 se deja solidificar en el frasco Reux en forma horizontal.

4. Preparar la solución salina isotónica, disolviendo 0.85 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada. Esterilizar bajo las mismas condiciones del medio número 1.

5. Tomar un tubo que contenga siembra reciente de *S. lutea*, suspender el microorganismo desarrollado en 5 ml de solución salina estéril haciendo uso del vortex.

6. Depositar y dispersar la suspensión obtenida en el paso 5 sobre la superficie del agar contenido en el frasco Reux.

7. Incubar el medio inoculado del frasco Reux a una temperatura de 37 °C por 24 h.

8. Extraer el crecimiento desarrollado con un volumen de 10-15 ml de solución salina estéril.

9. Preparar la siguiente suspensión a partir del inóculo obtenido en paso 8. Transmitancias 1.2-2.3 %. Para obtener esta transmitancia tomar 1.2 ml de la suspensión resultante del punto 8 (suspensión stock) y depositarlos en una celda para espectrofotómetro de 1 cm², diluir en la misma celda con 1.8 ml de solución salina estéril, agitar la celda auxiliándose de papel parafilm. Leer la transmitancia obtenida a 580 nm. Si la transmitancia no es la especificada diluir la suspensión stock con la solución salina estéril y leer nuevamente en la celda como ya se indicó.

Hacer las diluciones necesarias para obtener la transmitancia especificada.

NOTA: Utilizar un blanco de solución salina para hacer el ajuste a 100 % de transmitancia.

3.2. Preparación de soluciones para curva estándar de ampicilina.

MATERIAL.

21 Cajas petri de vidrio de 10 cm de diámetro.

Cilindros de acero inoxidable con diámetro exterior de 8 mm +/- 0.1 mm y diámetro interior de 6 mm +/- 0.1 mm con longitud de 10 mm.

Matraces volumétricos de 1000,500,100,50,25, y 10 ml.

Bureta de 25 ml.

Pipetas volumétricas de 1,2 y 5 ml.

2 Pipetas graduadas estériles de 25 ml.

Termómetro de 0-100 °C .

Micropipetas para dosificar 200 microlitros.

Cultivo reciente en tubo de *S. lutea* ATCC 9341.

REACTIVOS.

Medio No 11 para antibióticos marca Merck.

Sal de fosfato dibásico de potasio.

Sal de fosfato monobásico de potasio.

EQUIPO.

Autoclave a 121 °C y 22 psi de presión.

Colocador de cilindros marca Craft.

Medidor de halos de inhibición marca Fisher Lily.

Incubadora a 37 °C.

Balanza marca Mettler con exactitud de 0.0001 g.

Desarrollo experimental.

Preparación curva tipo.

1. Preparar 2 litros de solución buffer pH 8, disolviendo 33.46 g de fosfato dibásico de potasio y 1.04 g de fosfato monobásico de potasio, en 500 ml de agua destilada, llevar al aforo.

2. Preparar las siguientes soluciones, que se utilizan para establecer las curvas tipo de concentración para mezclas de antibióticos.

a) Pesar 25 mg de ampicilina.

b) Disolver en un matraz volumétrico de 25 ml y aforar con agua destilada .

c) Tomar una alícuota de 1 ml y diluirla en un matraz volumétrico de 10 ml con solución buffer pH 8 .

d) Tomar una alícuota de 1 ml y diluir a 100 ml, en un matraz volumétrico, con solución buffer pH 8.

e) Con esta última solución se elaboran las siguientes curvas tipo, que se utilizarán para determinación de la linealidad entre la dosis y la respuesta.

| Punto | Alícuota tomada | Aforo buffer pH 8 | Concentración (mcg/ml) |
|--------------|------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| A | 5.00 | 50 | 0.100 |
| B | 6.30 | 50 | 0.126 |
| C | 7.80 | 50 | 0.156 |
| D | 9.10 | 50 | 0.182 |
| E | 10.0 | 50 | 0.200 |

| Punto | Alícuota tomada | Aforo buffer pH 8 | Concentración (mcg/ml) |
|--------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| A | 2.0 | 25 | 0.080 |
| B | 5.0 | 50 | 0.100 |
| C | 6.3 | 50 | 0.126 |
| D | 7.8 | 50 | 0.156 |
| E | 9.1 | 50 | 0.182 |

3.3 Preparación y toma de muestras.

- 1. Remover el contenido del depósito que colecta el agua descargada por la planta de antibióticos , con la ayuda de una bara larga de aproximadamente 4 m de largo.**
- 2. Introducir un frasco con capacidad para 100 ml a la cisterna y tomar la muestra de agua residual.**
- 3. Tomar con pipeta volumétrica 1 ml de muestra y diluirla en un matraz aforado de 500 ml con agua destilada. Esta es la solución problema a la cual se le determinará el contenido de antibiótico activo.**

3.4 Preparación de agar base y agar inóculo para la evaluación de la potencia microbiológica.

-Agar Base.

- 1. Pesar 15.25g de medio de cultivo número 11 para antibióticos, disolver y dispersar en diferentes proporciones de agua destilada hasta completar un volumen 500 ml.**
- 2. Esterilizar el medio de cultivo en autoclave a 121 °C y 22 psi de presión por 15 min.**
- 3. Con pipeta estéril de 25 ml depositar 20 ml del medio esterilizado en el paso 2, en cada una de las 21 cajas petri (esterilizadas previamente por calor seco a 170 °C por dos horas).**
- 4. Solidificar el medio en las cajas petri.**

-Agar Semilla o inóculo.

- 1. Pesar 2.1g de medio número 11 para antibióticos dispersar y disolver en 100 ml de agua destilada .**
- 2. Esterilizar los medios de cultivo a 121 °C y 22 psi de presión por 15 min.**
- 3. Depositar 8 ml de suspensión del microorganismo preparada en el procedimiento 3.1 (transmitancia 1.2-2.3%) estando el agar del paso 2 a 50 °C +/- 1 °C .**

4. Con pipeta estéril depositar 5 ml de agar inoculado del paso 3, a cada una de las 21 cajas que contienen el agar base y homogenizar esta capa realizando movimientos en forma de ocho al depositar el inóculo.

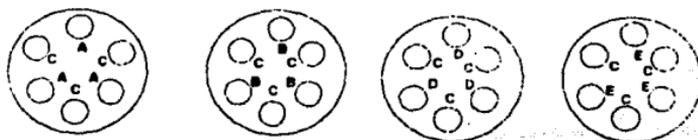
5. Dejar solidificar el agar depositado en las cajas.

6. Depositar en cada una de las cajas 6 cilindros (previamente esterilizados) utilizando el colocador de cilindros.

-Preparación de cajas con estándares y muestras de la cisterna.

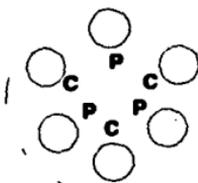
Dosificar con una micropipeta 200 microlitros de soluciones con concentración estándar (0.1-0.2 mcg/ml) A,B,C,D y E en cada uno de los cilindros depositados en las cajas petri de la siguiente manera:

1. Depositar en tres cajas de forma alternada solución que corresponde a la concentración del punto "A" y solución a la concentración "C", tal como se muestra en el siguiente esquema.



2. Hacer lo mismo con las soluciones de los puntos B,D y E .

3. Depositar de manera alternada la solución problema y la solución de concentración "C" de acuerdo al siguiente esquema.



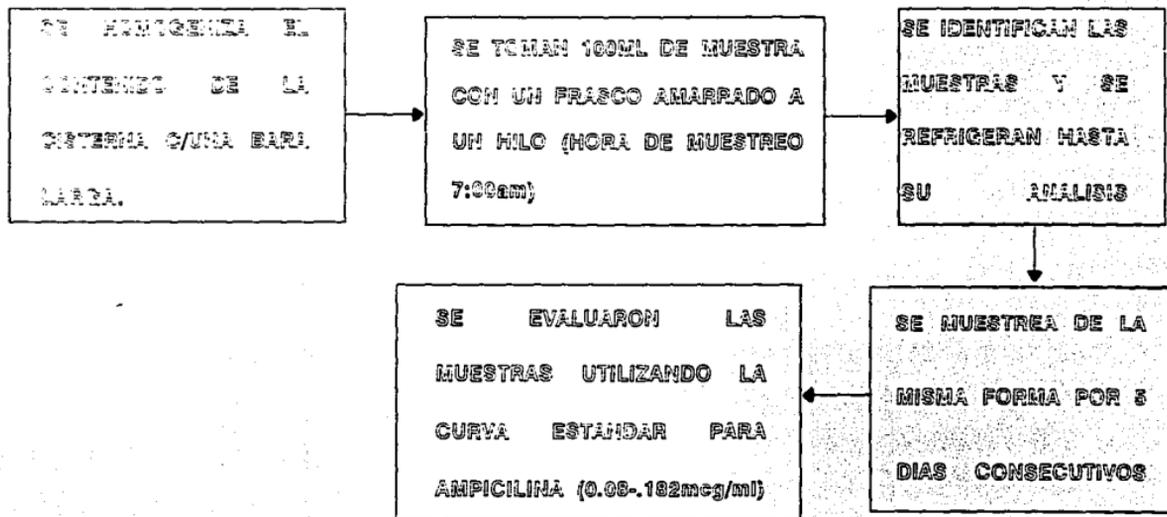
4. Las cajas se incuban por 24 horas a 37 °C.

5. Leer los halos de inhibición con ayuda del lector.

6. Repetir los pasos 1,2,3,4 y 5 con las cajas preparadas con la segunda serie de estándares (0.08-0.18 mcg/ml).

4.DETERMINACION DEL PATRON DE DESCARGA DIARIO EN PLANTA

ESQUEMA 16. DETERMINACION DEL PATRON DE DESCARGA



4.DETERMINACION DEL PATRON DE DESCARGA DIARIO EN PLANTA.

4.1 Toma de muestras.

Muestrear diariamente por 5 días consecutivos el agua descargada en la cisterna de acuerdo a lo siguiente.

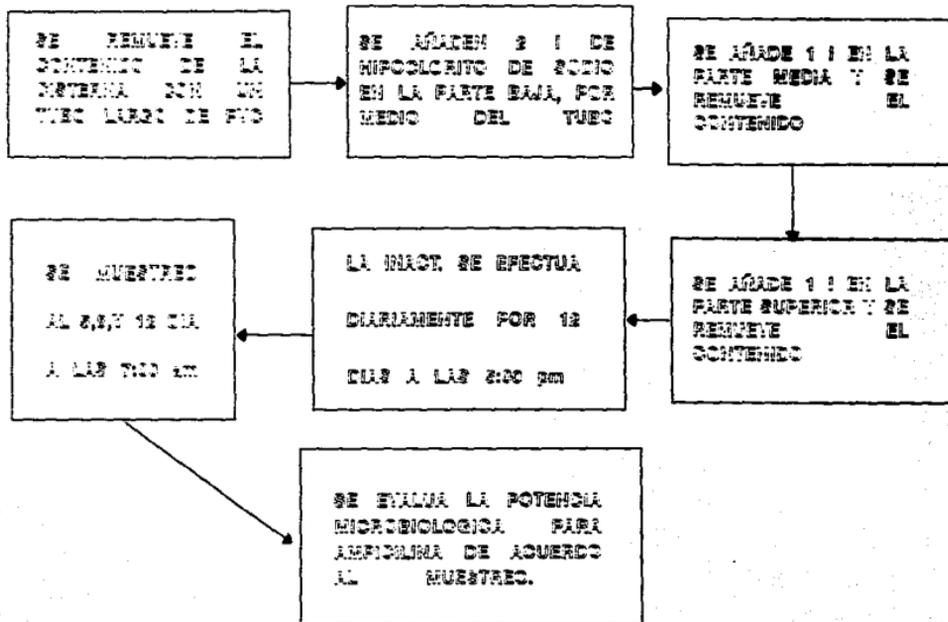
- 1. Homogenizar el contenido de la cisterna auxiliándose de una bara de 5 m de largo.**
- 2. Amarrar un frasco de 100 ml a un hilo y depositarlo en la cisterna, remover el frasco en zig zag y tomar la muestra.**
- 3. Tapar e identificar el frasco con la fecha de toma de muestra. Refrigerar la muestra.**
- 4. Repetir los pasos 1,2 y 3 durante los cuatro días restantes.**

NOTA: Las muestras fueron tomadas a las 7:00 am, antes de que la planta iniciara sus operaciones normales.

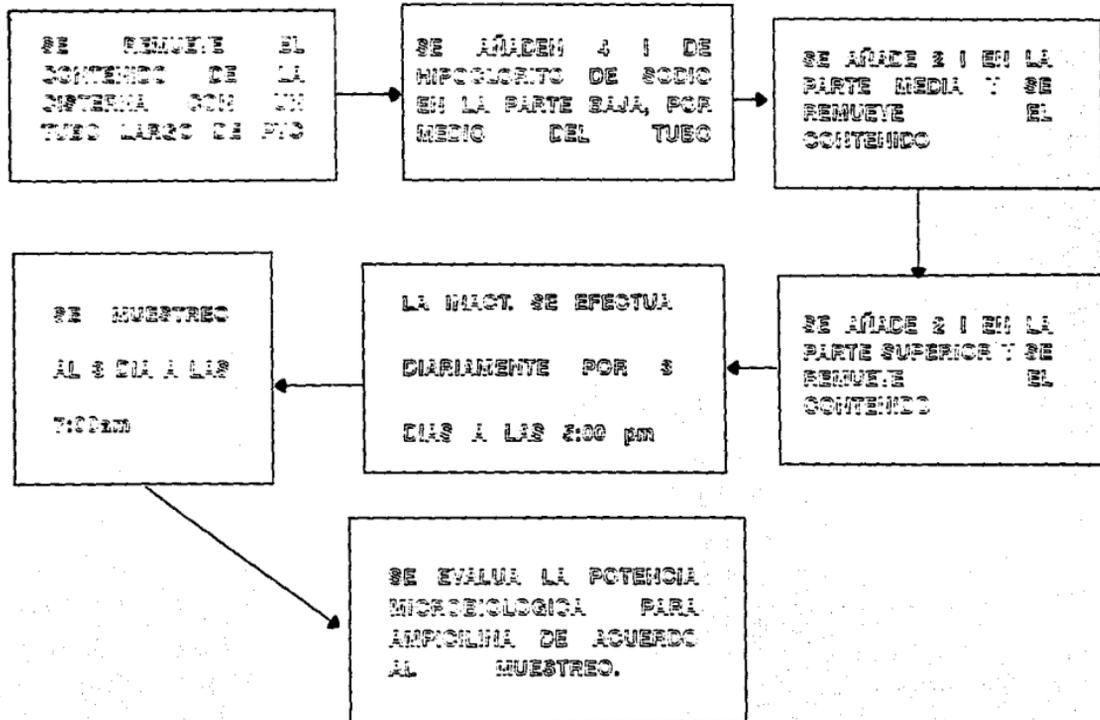
5. Analizar las muestras con el método para ampicilina tomando la curva de concentración 0.08-0.18 mcg/ml.

**5. INACTIVACION DEL
ANTIBIOTICO ACTIVO CON
HIPOCLORITO DE SODIO EN LA
CISTERNA DE TRATAMIENTO.**

ESQUEMA 17. INACTIVACION, EN LA CISTERNA DE TRATAMIENTO, CON 4 LITROS DE HIPOCLORITO DE SODIO.



ESQUEMA 18. INACTIVACION, EN LA CISTERNA DE TRATAMIENTO, CON 8 LITROS DE HIPOCLORITO DE SODIO.



5. INACTIVACION DEL ANTIBIOTICO ACTIVO CON HIPOCLORITO DE SODIO EN LA CISTERNA DE TRATAMIENTO .

1. Introducir en la cisterna un tubo de aproximadamente 5 m de largo (este tubo tiene contacto con el fondo de la cisterna).

2. Por el orificio del tubo adicionar 2 litros de hipoclorito de sodio al 11.7 % , agitar el agua de la cisterna.

3. Adicionar 1 litro de hipoclorito de sodio al 11.7% a la mitad de la cisterna y agitar el contenido de la cisterna.

4. Finalmente adicionar 1.5 de litros de hipoclorito de sodio al 11.7 % en la parte superior de la cisterna.

NOTA: Efectuar este mismo procedimiento por 12 días consecutivos y efectuar el análisis para ampicilina (concentración 0.08-0.18 mcg/ml) al sexto, octavo y onceavo día de inactivación. La toma de muestras se realiza de igual forma como se indicó en 4.1 pero realizando una dilución de 1 ml en 500ml de agua destilada.

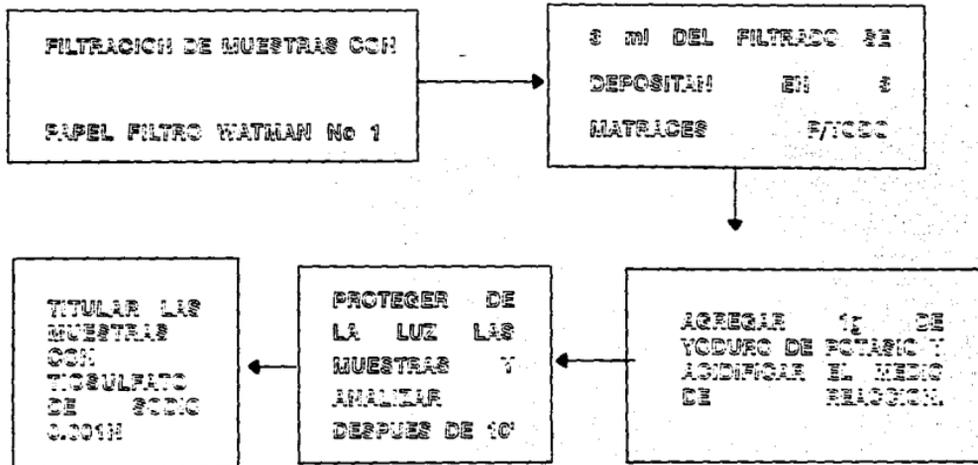
Segunda fase se inactivación.

5. Inactivar con ocho litros de hipoclorito de sodio al 10.9 % por 3 días consecutivos evaluando al 3 día por el método de ampicilina (concentración 0.08-0.18 mcg/ml).

NOTA: Los volúmenes adicionados a los diferentes niveles de la cisterna fueron de 4, 2 y 2 litros respectivamente.

6. DETERMINACION DEL HIPOCLORITO RESIDUAL EN LAS MUESTRAS INACTIVADAS.

ESQUEMA 19. DETERMINACION DEL HIPOCLORITO RESIDUAL EN LAS MUESTRAS INACTIVADAS



6.DETERMINACION DEL HIPOCLORITO RESIDUAL EN LAS MUESTRAS INACTIVADAS.

MATERIAL.

Papel filtro Whatman del número 1.

Embudo de vidrio tallo corto.

Bureta de 25 ml.

4 matraces para titulación de yodo.

Pipetas volumétricas de 5 ml y 1 ml.

2 Pipetas graduadas de 5 ml.

Magnetos de agitación.

Matraz aforado de 100 ml.

REACTIVOS.

Sal de yoduro de potasio.

Tiosulfato de sodio 0.001 N (diluir 1 ml de solución de tiosulfato de sodio 0.1 N y aforar a 100 ml con agua destilada).

Solución indicadora de almidón.

Acido acético 6 N.

DESARROLLO.

1. Filtrar una muestra recién tomada de la cisterna con dos unidades de papel filtro Whatman del No 1.

2. Transferir 5 ml del filtrado a 3 matraces para yodo.

3. Agregar 1g de yoduro de potasio a cada uno de los matraces que contienen muestra de la cisterna.

4. Agregar 5 ml de solución de ácido acético a los matraces y proteger de la luz las muestras, por un período de 10 min.

5. Después de 10 min agregar 3 ml de solución indicadora de almidón (cuando la solución contiene hipoclorito residual se torna de color oscura).

6. Titular el contenido de cada uno de los matraces con solución de tiosulfato de sodio 0.001 N gota a gota hasta que las soluciones queden incoloras.

VI . RESULTADOS

VI. RESULTADOS.

1.CONDICIONES OPTIMAS DE INACTIVACION DE BETA LACTAMICOS .

1.1 Estudios preliminares.

PROPORCION 1:5 ANTIBIOTICO HIPOCLORITO DE SODIO. Cuando se adicionó hipoclorito de sodio a la solución de antibiótico ajustada a pH 8 , éste se incremento hasta un valor de 12 (papel tornasol). El tiempo de reacción se efectuó en 2 horas. Después de este tiempo la solución el pH baja hasta un valor de 7.

En esta proporción se encontró un exceso de hipoclorito de sodio que no pudo ser cuantificado.

La solución ajustada a pH 10 las condiciones observadas fueron las mismas que a pH 8.

PROPORCION 1:1 ANTIBIOTICO HIPOCLORITO. Al adicionar hipoclorito de sodio a la muestra con pH 7, se incrementó hasta un valor de 12 (papel tornasol) y al final de la reacción el pH fue de 7. Al inicio de la reacción la solución se tornó de incolora a amarillo, el tiempo que permaneció esta coloración fue de 10 minutos. El exceso de hipoclorito de sodio si pudo ser cuantificado.

1.2 Condiciones óptimas.

A continuación se presentan los resultados de la inactivación con hipoclorito de sodio de la técnica optimizada utilizando mezcla de antibióticos.

TABLA 1. INACTIVACION CON HIPOCLORITO DE SODIO.

| Muestra ml de Tiosulfato Consumidos | Cr (mg) | Ci-Cr = Crx (mg) |
|-------------------------------------|---------|------------------|
| 1 11.5 | 43.26 | 22.94 |
| 2 11. 3 | 42.51 | 23.70 |
| 3 11.4 | 42.89 | 23.32 |

Ci = Cantidad de NaClO adicionada = 66.21 mg

Cr = Cantidad de NaClO residual.

Crx = Cantidad de NaClO que reaccione con el antibiótico.

2. ESTUDIO DE POTENCIA MICROBIOLÓGICA CON MEZCLAS DE ANTIBIÓTICOS.

Las curvas se trabajaron en 5 niveles de concentración A,B,C,D Y E. Se calcularon los valores promedio de la concentración intermedia (C), presente en cada una de las cajas inoculadas. Los valores obtenidos de "C" fueron promediados nuevamente para obtener un promedio general.

Ejemplo.

$$C_A + C_B + C_D + C_E = C_p$$

Se restó al gran promedio (Cp), el valor Cx de cada concentración, obteniéndose una diferencia positiva o negativa. La diferencia resultante fue sumada o restada al valor promedio del halo de inhibición obtenido para cada nivel de concentración.

Ejemplo.

$$C_p - C_A = +/- C_x \quad , \quad A +/- C_x = \text{Halo de inhibición de la concentración A ajustado.}$$

NOTA: Se tomó como referencia la transmitancia utilizada para el método de potencia para ampicilina en todos los estudios.

ESTUDIO 1

VALORES DE INHIBICION EN mm ENCONTRADOS A UNA TRANSMITANCIA DEL MICROORGANISMO DEL 1.2%. UTILIZANDO UN ESTANDAR DE MEZCLA DE ANTIBIOTICOS.

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | P1 | PC1 | P2 | PC2 |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10.6 | 11.2 | 8.6 | 1.6 | 12.8 | 11.8 | 12.0 | 11.6 | 12.4 | 11.2 | 10.8 | 11.2 |
| 10.8 | 10.2 | 11.6 | 10.2 | 11.8 | 12.0 | 13.0 | 10.8 | 12.4 | 11.8 | 11.4 | 12.4 |
| 10.4 | 11.4 | 11.2 | 11.6 | 11.8 | 11.2 | 12.2 | 12.6 | 13.0 | 11.4 | 10.6 | 12.6 |
| 9.8 | 9.2 | 10.8 | 11.2 | 10.8 | 11.4 | 11.8 | 12.4 | 12.0 | 11.2 | 11.6 | 10.8 |
| 11.0 | 12.8 | 11.0 | 11.2 | 12.2 | 11.0 | 11.2 | 11.2 | 11.6 | 11.8 | 12.4 | 10.8 |
| | 9.8 | 11.4 | 11.6 | 12.6 | 13.0 | 12.0 | 10.8 | 11.8 | 11.4 | 13.0 | 12.4 |
| | | | | 13.0 | 10.2 | 11.8 | 11.8 | 11.6 | 12.4 | 11.2 | 12.2 |
| | | | | 11.2 | 11.8 | 11.2 | 11.6 | 12.0 | 11.8 | 12.6 | 11.8 |
| | | | | 12.2 | | 11.2 | 11.4 | 12.8 | 11.4 | 11.4 | 11.2 |
| PROM. | 10.52 | | 10.77 | | 12.27 | | 12.16 | | 12.18 | | 11.17 |
| GRAN PROMEDIO : | | 10.77 | | 11.27 | | 11.55 | | 11.58 | | 11.82 | 11.78 |

VALORES AJUSTADOS

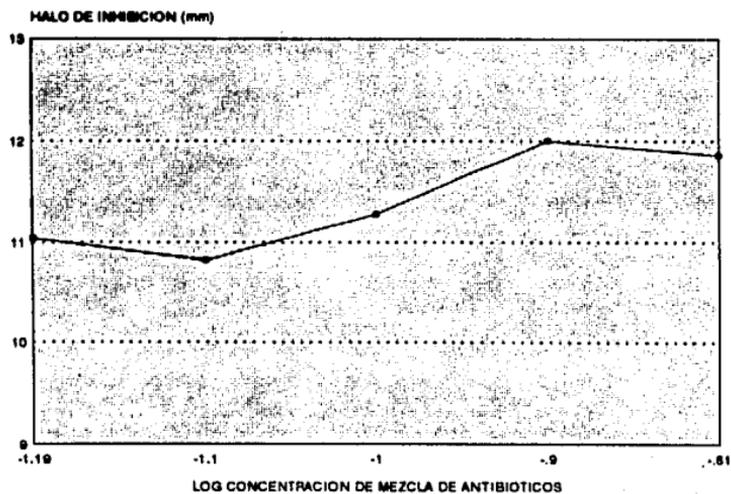
| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (C) | X' log c' |
|-------|-----------|------------------------|--------------|
| A | 11.04 | 0.064 | -1.19 |
| B | 10.82 | 0.080 | -1.10 |
| C | 11.28 | 0.100 | -1.00 |
| D | 12.00 | 0.124 | -0.90 |
| E | 11.86 | 0.156 | -0.81 |
| P1 | 11.64 | 0.120 | -0.91 |
| P2 | 11.17 | 0.130 | -0.89 |

CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS:
 P1 = 267.12 g / 2226 LITROS CISTERNA 1
 P2 = 281.28 g / 2226 LITROS CISTERNA 2
 DILUCION 1 / 1000

COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.87
 PENDIENTE (m) = 2.96
 ORDENADA AL ORIGEN (b) = 14.36

ESTUDIO 1

MEZCLA DE ANTIBIOTICOS TRANSMITANCIA 1.2 %



ESTUDIO 2

VALORES DE INHIBICION EN mm ENCONTRADOS A UNA TRANSMITANCIA DEL MICROORGANISMO DEL 1,2 % UTILIZANDO UN ESTANDAR DE MEZCLA DE ANTIBIOTICOS.

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | P1 | PC1 | P2 | PC2 |
|-----------------|-------|------|------|------|------|-------|------|-------|-------|------|-------|
| 12.0 | 10.2 | 9.0 | 9.8 | 9.2 | 9.2 | 11.8 | 9.8 | 12.4 | 11.8 | 11.6 | 9.2 |
| 10.3 | 8.2 | 8.8 | 9.2 | 10.1 | 10.2 | 10.6 | 10.4 | 11.8 | 12.4 | 9.8 | 10.1 |
| 10.4 | 10.2 | 8.4 | 9.8 | 9.8 | 8.6 | 10.3 | 10.0 | 11.4 | 12.8 | 9.4 | 9.8 |
| 10.6 | 9.6 | 10.6 | 8.8 | 9.6 | 7.8 | 9.2 | 9.2 | 10.0 | 9.4 | 9.4 | 11.6 |
| 8.8 | 10.2 | 8.4 | 9.8 | 9.4 | 9.4 | 9.6 | 9.4 | 9.4 | 11.4 | 9.2 | 9.2 |
| 10.2 | | 7.8 | 9.4 | 9.4 | 10.4 | 9.2 | 10.0 | 9.6 | 10.8 | 10.4 | 10.6 |
| | | 10.4 | 9.8 | 10.0 | 9.4 | 9.4 | 10.0 | 9.9 | 10.0 | 9.8 | 9.6 |
| | | 8.1 | 9.6 | 11.6 | 9.8 | 10.8 | 9.0 | 11.8 | 10.8 | 10.0 | 10.8 |
| | | 7.8 | | 9.4 | 9.6 | 8.0 | | 9.2 | 10.6 | 9.4 | 10.8 |
| | | | | | | | | 10.0 | 10.6 | | |
| | | | | | | | | 10.0 | 10.6 | | |
| | | | | | | | | 8.2 | 8.4 | | |
| | | | | | | | | 7.8 | 9.2 | | |
| | | | | | | | | 7.0 | 8.4 | | |
| | | | | | | | | | 8.6 | | |
| | | | | | | | | | 9.2 | | |
| FROM. | 10.36 | 8.48 | 8.84 | 9.92 | 9.92 | 10.11 | 9.71 | 10.01 | 10.31 | 9.89 | 10.22 |
| GRAN PROMEDIO : | 9.56 | | | | | | | | | | |

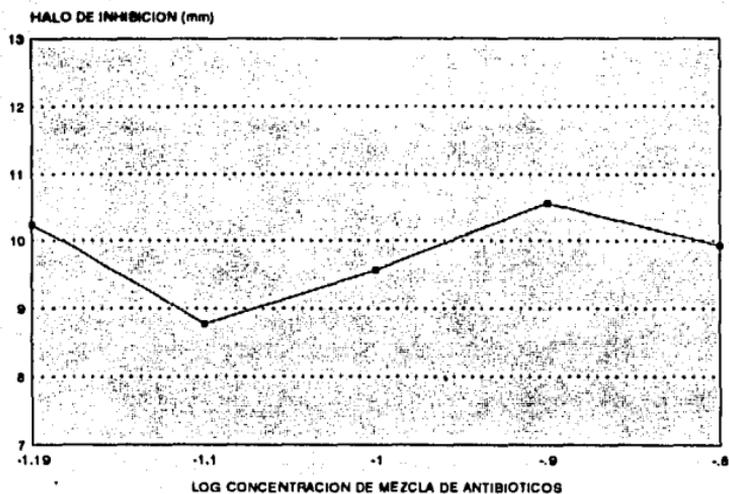
VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (C) | X' log C |
|-------|--------|---------------------|----------|
| A | 10.23 | 0.064 | -1.19 |
| B | 8.77 | 0.080 | -1.10 |
| C | 9.56 | 0.100 | -1.00 |
| D | 10.56 | 0.128 | -0.90 |
| E | 9.93 | 0.156 | -0.81 |
| P1 | 9.25 | 0.031 | -1.50 |
| P2 | 9.22 | 0.029 | -1.53 |

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS: | COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.24 |
| P1 = 69.00 g / 2226 LITROS CISTERNA 1 | FERMENTE (m) = 0.39 |
| P2 = 64.55 g / 2226 LITROS CISTERNA 2 | ORIGEN (h) = 10.74 |
| DILUACION 1 / 1000 | |

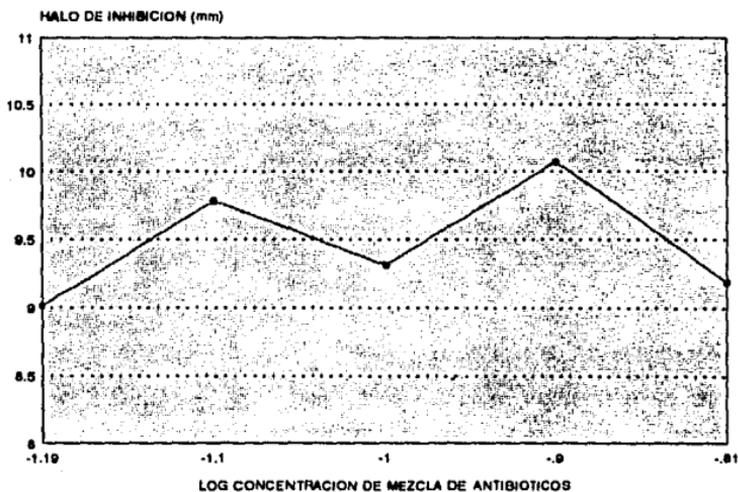
ESTUDIO 2

MEZCLA DE ANTIBIOTICOS TRANSMITANCIA 1.2



ESTUDIO 3

MEZCLA DE ANTIBIOTICOS TRANSMITANCIA 2.6 %



ESTUDIO 4

VALORES DE INHIBICION OBTENIDOS A UNA TRANSMITANCIA DEL MICROORGANISMO DEL 2.6 %. UTILIZANDO UN ESTANDAR DE MEZCLA DE ANTIBIOTICOS.

| A | CA | H | CB | D | CD | E | CE | P1 | PC1 | P2 | PC2 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 11.0 | 9.8 | 9.4 | 11.2 | 10.6 | 10.0 | 10.2 | 9.8 | 8.6 | 10.2 | 9.2 | 9.8 |
| 9.4 | 12.2 | 9.4 | 14.2 | 10.8 | 10.2 | 10.2 | 11.6 | 9.4 | 10.4 | 9.2 | 9.8 |
| 8.6 | 10.2 | 10.2 | 9.6 | 9.2 | 9.6 | 10.6 | 10.2 | 9.6 | 10.2 | 9.8 | 9.2 |
| 9.0 | 10.6 | 9.6 | 10.6 | 9.8 | 12.2 | 10.9 | 10.0 | 10.0 | 10.2 | 9.0 | 10.0 |
| 10.0 | 10.2 | 11.8 | 10.8 | 10.2 | 9.2 | 10.8 | 10.4 | 9.8 | 11.0 | 10.4 | 9.0 |
| 9.0 | 11.6 | 11.4 | 10.6 | 9.0 | 9.2 | 12.6 | 9.4 | 10.0 | 11.0 | 9.6 | 9.0 |
| 10.2 | 10.0 | 9.6 | 10.0 | 9.8 | 10.0 | 12.6 | 10.6 | 10.2 | 10.4 | 8.6 | 8.8 |
| 9.2 | 9.4 | 11.2 | 9.6 | 10.0 | 9.6 | 12.0 | 11.8 | 9.4 | 10.8 | 9.8 | 10.2 |
| 9.6 | 10.0 | 11.4 | | 10.0 | 9.6 | 12.2 | 11.0 | 9.8 | 9.2 | 9.4 | 10.0 |

PRCH. 9.56 10.44 9.85 11.13 9.64 9.16

 10.6 10.83 10.0 10.76 10.38 7.18

GRAN PROMEDIO : 10.55

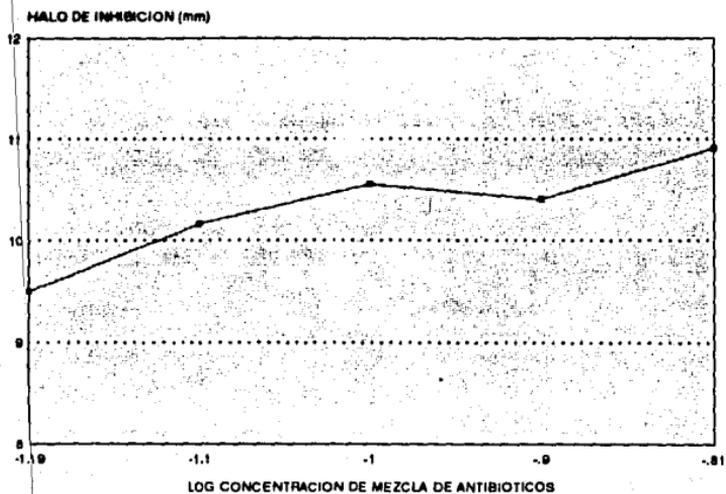
VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (C) | X' log C |
|-------|-----------|------------------------|-------------|
| A | 9.50 | 0.064 | -1.19 |
| B | 10.16 | 0.090 | -1.10 |
| C | 10.55 | 0.100 | -1.00 |
| D | 10.15 | 0.176 | -0.75 |
| E | 10.21 | 0.158 | -0.81 |
| P1 | 9.82 | 0.099 | -1.15 |
| P2 | 10.41 | 0.150 | -0.82 |

| | |
|--|-------------------------------------|
| CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS: | COEFICIENTE DE CORRELACION (R) 0.91 |
| P1 = 155.82 g / 2224 LITROS CISTERNA 1 | PENDIENTE (m) = 4.16 |
| P2 = 222.6 g / 2224 LITROS CISTERNA 2 | ORDENADA AL ORIGEN (b) = 11.16 |
| DILUCION 1 / 1000 | |

ESTUDIO 4

MEZCLA DE ANTIBIOTICOS . TRANSMITANCIA 2.6 %



ESTUDIO 5

VALORES DE INHIBICION OBTENIDOS A UNA TRANSMITANCIA DEL MICROORGANISMO DEL 4.0 % . UTILIZANDO UN ESTANDAR DE MEZCLA DE ANTIBIOTICOS .

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | P1 | PC1 | P2 | PC2 |
|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 13.0 | 13.8 | 9.6 | 8.4 | 13.4 | 11.8 | 11.6 | 9.4 | 14.8 | 15.2 | 12.8 | 16.3 |
| 10.2 | 12.4 | 9.2 | 9.0 | 11.0 | 11.6 | 10.8 | 10.6 | 14.4 | 15.4 | 10.8 | 13.0 |
| 11.4 | 14.4 | 11.2 | 8.6 | 13.2 | 14.2 | 11.4 | 10.8 | 13.4 | 13.4 | 14.0 | 11.0 |
| 11.4 | 12.0 | 8.8 | 8.6 | 14.0 | 12.6 | 12.2 | 10.2 | 12.6 | 12.8 | 14.8 | 12.8 |
| 10.4 | 11.0 | 10.2 | 9.4 | 11.8 | 10.4 | 12.8 | 12.1 | 13.8 | 12.8 | 13.8 | 15.4 |
| 11.0 | 12.0 | 10.2 | 9.0 | 11.9 | 12.4 | 15.8 | 13.0 | 13.2 | 11.6 | 15.0 | 12.2 |
| 9.8 | 10.8 | 8.8 | 9.2 | 12.2 | 14.2 | 14.8 | 11.8 | 12.4 | 15.2 | 9.6 | 11.0 |
| 9.8 | 11.2 | 7.6 | 7.6 | 14.2 | | | 14.8 | 10.8 | 14.8 | 9.6 | 14.0 |
| 13.2 | 12.4 | 9.2 | 9.4 | 10.0 | | | | 12.0 | 15.2 | 11.6 | |

PROM. 11.16 12.22 9.42 8.87 12.85 12.48 12.77 11.91 13.04 14.04 12.44 13.29

GRAN PROMEDIO : 11.17

VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (C) | X' log C |
|-------|-----------|------------------------|-------------|
| A | 10.51 | 0.064 | -1.19 |
| B | 11.93 | 0.080 | -1.10 |
| C | 11.17 | 0.100 | -1.00 |
| D | 11.75 | 0.126 | -0.90 |
| E | 12.22 | 0.156 | -0.81 |
| P1 | 10.17 | 0.044 | -1.35 |
| P2 | 10.51 | 0.140 | -1.30 |

CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS:

P1 = 97.94 g / 2226 LITROS CISTERNA 1

P2 = 89.04 g / 2226 LITROS CISTERNA 2

DILUCION 1 / 1000

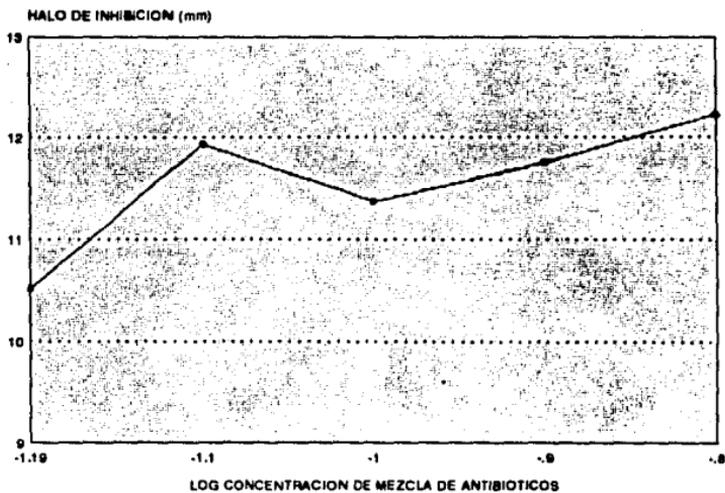
COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.76

PENDIENTE (m) = 1.12

ORDENADA AL ORIGEN (b) = 14.88

ESTUDIO 5

MEZCLA DE ANTIBIOTICOS TRANSMITANCIA 4.0 %



3. ESTUDIOS DE POTENCIA MICROBIOLÓGICA PARA AMPICILINA.

ESTUDIO 6

HALOS DE INHIBICIÓN EN mm ORTENTOS UTILIZANDO UN ESTANDAR DE AMPICILINA TRIHIDRATA A UNA CONCENTRACION DE LA CURVA 0.1/0.2 mcg/ml. SE INACTIVARON LAS AGUAS DE LA CISTERNA CON 4.5 l DE HIPOCLORITO DE SODIO AL 11.75.

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | PI | PCI |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 10.8 | 13.8 | 15.6 | 17.2 | 18.6 | 14.4 | 16.4 | 17.6 | 8.2 | 17.0 |
| 15.2 | 15.8 | 15.0 | 18.2 | 17.0 | 18.8 | 17.6 | 8.4 | 17.0 | 10.8 |
| 11.4 | 13.8 | 16.4 | 14.6 | 17.8 | 17.2 | 18.4 | 17.1 | 17.8 | 18.0 |
| 10.2 | 17.4 | 15.8 | 17.4 | 18.2 | 15.0 | 18.6 | 17.4 | 8.4 | 16.8 |
| 13.8 | 16.4 | 17.0 | 17.2 | 18.0 | 16.4 | 18.8 | 18.0 | 8.8 | 17.4 |
| 9.2 | 17.6 | 16.2 | 17.8 | 15.6 | 17.0 | 19.2 | 15.2 | 9.0 | 16.6 |
| 16.4 | 16.4 | 16.8 | 16.8 | 18.2 | 17.0 | 18.0 | 17.4 | 8.8 | 17.2 |
| 17.4 | 17.4 | 14.6 | 14.6 | 17.8 | 17.2 | 19.2 | 16.0 | 9.4 | 17.2 |
| 17.8 | 17.6 | 17.6 | 14.0 | 17.2 | 18.2 | 16.4 | 8.2 | 17.2 | 11.6 |

PROM. 13.28 16.20 16.20 16.33 17.42 16.40 18.80 17.08 8.60 17.15

GRAN PROMEDIO : 16.50

VALORES AJUSTADOS

| PROBTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (C) | X' log C |
|--------|-----------|------------------------|-------------|
| A | 13.28 | 0.199 | -1.00 |
| B | 16.18 | 0.126 | -0.89 |
| C | 16.50 | 0.156 | -0.80 |
| D | 17.52 | 0.183 | -0.74 |
| E | 17.83 | 0.200 | -0.69 |
| PI | 6.95 | 0.076 | -1.01 |

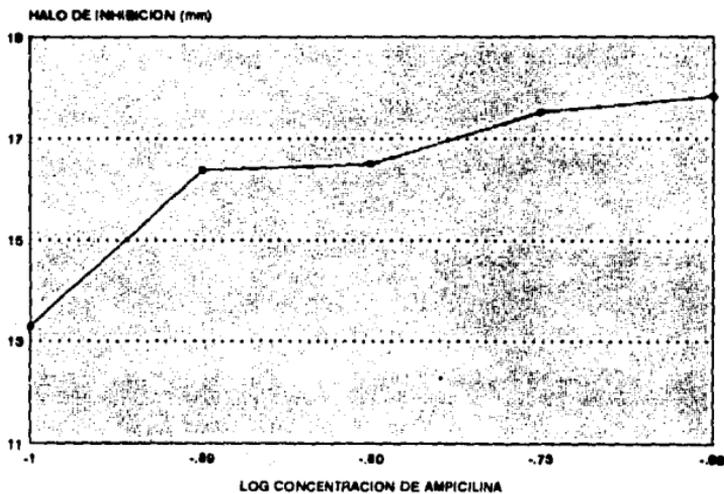
CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS:
PI = 213.5 g / 2226 LITROS CISTERNA 1

COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.52
PENDIENTE (m) = 11.58
ORDENADA AL ORIGEN (b) = 19.00

DILUCION 1 / 1000

ESTUDIO 6

AMPICILINA TRIHIDRATADA. TRANSMITANCIA 1.3-2.3 % 0.1-0.2 mcg/ml



ESTUDIO 7

VALORES DE INHIBICION EN mm OBTENIDOS UTILIZANDO UN ESTANDAR DE AMPICILINA A UNA CONCENTRACION DE 0.08/0.182 mcg/ml (LINEARIDAD DE LA CURVA)

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 10.2 | 12.8 | 11.2 | 12.6 | 13.0 | 13.2 | 14.4 | 12.2 |
| 10.4 | 13.0 | 12.0 | 12.2 | 13.6 | 13.2 | 14.4 | 12.4 |
| 10.6 | 12.4 | 11.2 | 11.8 | 14.8 | 12.2 | 13.6 | 12.8 |
| 11.0 | 12.6 | 11.2 | 12.6 | 14.0 | 12.0 | 14.2 | 12.4 |
| 10.0 | 12.2 | 11.2 | 12.4 | 13.2 | 12.6 | 14.6 | 12.8 |
| 10.4 | 12.4 | 11.4 | 13.2 | 13.2 | 12.2 | 13.8 | 12.8 |
| 10.8 | 13.0 | 11.6 | 12.2 | 14.2 | 13.0 | 14.0 | |
| | | | | | 12.6 | 14.2 | |

PROM. 12.62 10.77 12.42 11.40 12.62 13.71 12.56 14.15

GRAN PROMEDIO : 12.56

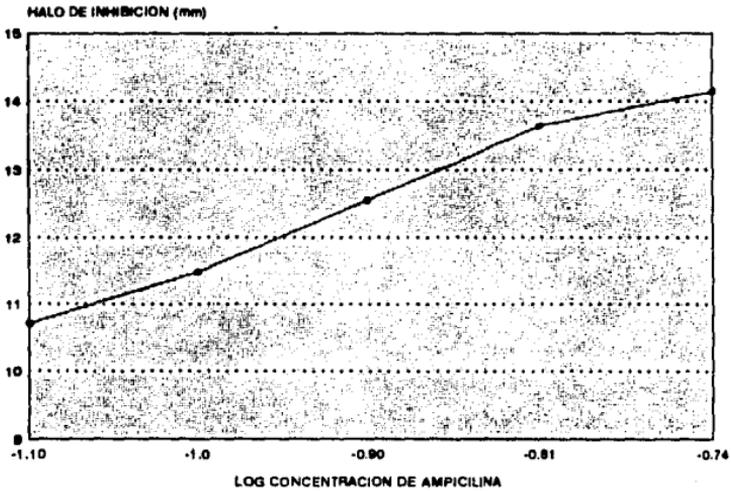
VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (mcg/ml) | X' log C |
|-------|-----------|--------------------------------|-------------|
| A | 10.70 | 0.080 | -1.10 |
| B | 11.48 | 0.100 | -1.00 |
| C | 12.55 | 0.125 | -0.90 |
| D | 13.64 | 0.156 | -0.81 |
| E | 14.14 | 0.182 | -0.74 |

CORFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.99
 PENDIENTE (m) = 9.94
 ORDENADA AL ORIGEN (b) = 21.5

ESTUDIO 7

AMPICILINA TRIHIDRATADA TRANSMITANCIA 1.3-2.3 % 0.06/0.182 mcg/ml



4.DETERMINACION DEL PATRON DE DESCARGA DIARIO EN PLANTA.

ESTUDIO 6

VALORES DE INHIBICION EN mm OBTENIDOS EN LA EVALUACION DEL CONTENIDO DE ANTIBIOTICO ACTIVO EN CINCO DIAS DIFERENTES UTILIZANDO UN ESTANDAR DE AMPICILINA TRIHIDRATADA A UNA CONCENTRACION DE 0.08/0.182 mcg/ml

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | 10.11.93 | | 01.12.93 | |
|-----------------|-------|----------|-------|----------|-------|-------|-------|----------|------|----------|-------|
| | | | | | | | | P1 | PC1 | P2 | PC2 |
| 13.20 | 16.0 | 14.2 | 15.4 | 17.6 | 16.0 | 17.6 | 15.2 | 21.0 | 16.0 | 24.0 | 15.6 |
| 13.6 | 15.2 | 14.2 | 15.2 | 16.8 | 15.8 | 17.6 | 15.2 | 21.2 | 15.2 | 24.6 | 14.2 |
| 13.2 | 15.8 | 14.8 | 15.6 | 17.4 | 16.4 | 18.0 | 15.8 | 21.8 | 15.6 | 23.0 | 15.4 |
| 12.6 | 15.2 | 14.6 | 15.2 | 17.4 | 15.6 | 17.8 | 15.6 | 20.6 | 15.0 | 23.8 | 15.2 |
| 13.2 | 15.4 | 14.8 | 15.6 | 16.8 | 16.4 | 18.2 | 15.6 | 21.6 | 15.4 | 24.2 | 15.4 |
| 13.0 | 15.6 | 14.8 | 15.8 | 16.8 | 16.0 | 18.6 | 16.0 | 21.6 | 16.6 | 24.6 | 14.0 |
| 13.0 | 15.6 | 14.8 | 16.2 | 16.8 | 16.0 | 17.2 | 16.2 | 22.0 | 15.2 | 24.2 | 14.8 |
| 12.8 | 15.2 | 15.0 | 16.0 | 16.6 | 16.0 | 18.2 | 15.8 | 22.0 | 15.6 | 24.8 | 15.4 |
| 15.6 | | 15.6 | | 15.8 | 18.2 | | | 20.8 | 15.8 | | |
| PROM. | 13.65 | | 14.65 | | 17.02 | | 17.93 | | 21.4 | | 23.87 |
| | | 15.50 | | 15.63 | | 16.03 | | 15.67 | | 15.58 | 15.23 |
| GRAN PROMEDIO : | 15.7 | | | | | | | | | | |
| 02.12.93 | | 03.12.93 | | 04.12.93 | | | | | | | |
| P3 | PC3 | P4 | PC4 | P5 | PC5 | | | | | | |
| 10.2 | 14.8 | 12.8 | 14.2 | 15.2 | 14.0 | | | | | | |
| 9.3 | 14.0 | 10.2 | 14.4 | 15.2 | 13.2 | | | | | | |
| 8.6 | 14.4 | 10.0 | 14.0 | 15.8 | 14.4 | | | | | | |
| 10.8 | 14.2 | 10.2 | 14.2 | 13.4 | 14.2 | | | | | | |
| 9.0 | 14.2 | 12.6 | 14.4 | 15.6 | | | | | | | |
| 10.0 | 13.8 | 10.0 | 13.4 | | | | | | | | |
| 8.8 | | 13.0 | 14.2 | | | | | | | | |
| 9.0 | | | 14.8 | | | | | | | | |
| 8.8 | | | | | | | | | | | |
| PROM. | 10.37 | | 11.93 | | 13.9 | | | | | | |
| | | 14.31 | | 13.93 | | 13.9 | | | | | |

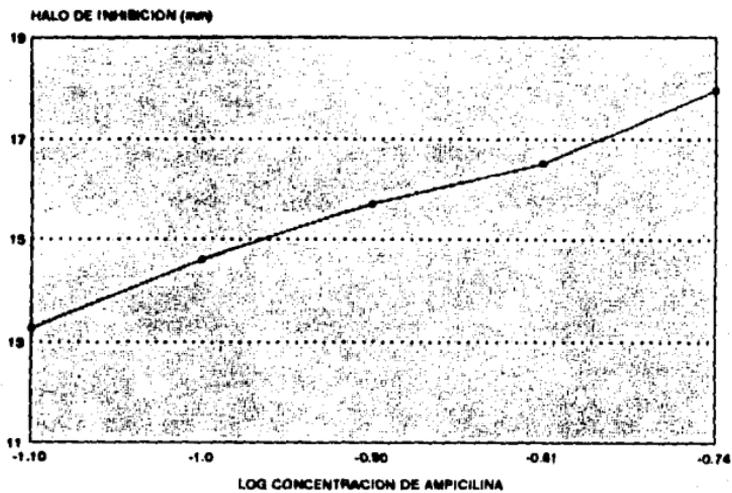
VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (mcg/ml) | X' log C |
|-------|-----------|--------------------------------|-------------|
| A | 13.27 | 0.080 | -1.10 |
| B | 14.60 | 0.100 | -1.00 |
| C | 15.70 | 0.125 | -0.90 |
| D | 16.51 | 0.160 | -0.81 |
| E | 17.96 | 0.180 | -0.74 |
| P1 | 21.61 | 0.370 | -0.42 |
| P2 | 24.85 | 0.631 | -0.16 |
| P3 | 30.37 | 0.048 | -1.31 |
| P4 | 11.02 | 0.075 | -1.11 |
| P5 | 15.70 | 0.125 | -0.74 |

| | |
|--|--|
| CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS: CISTEPNA I P1 = 419.15 g / 2226 LITROS P2 = 769.08 g / 2226 LITROS P3 = 51.19 g / 2226 LITROS P4 = 81.47 g / 2226 LITROS P5 = 119.12 g / 2226 LITROS DILUACION 1 / 500 | COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.99 PENDIENTE (m) = 12.31 ORDENADA AL ORIGEN (b) = 26.82 |
|--|--|

ESTUDIO 8

AMPICILINA TRIHIDRATADA 0.06/0.182 mcg/ml /PATRON DE DESCARGA DIARIO



5. INACTIVACION DEL ANTIBIOTICO ACTIVO CON HIPOCLORITO DE SODIO EN LA CISTERNA DE TRATAMIENTO.

ESTUDIO 9

VALORES DE INHIBICION OBTENIDOS EN mm DE LA EVALUACION HASTA SEXTO DIA DE INACTIVACION CON 4 L DE HIPOCLORITO DE SODIO, UTILIZANDO UN ESTANDAR DE AMPICILINA TRIHIDRATADA EN UNA CONCENTRACION DE 0.08/0.182 mcg/ml.

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | PI | PCI |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|-------|
| 14.6 | 16.2 | 15.8 | 18.2 | 18.6 | 16.2 | 17.4 | 16.2 | 7.8 | 17.4 |
| 14.6 | 16.8 | 15.4 | 17.0 | 19.9 | 17.0 | 18.6 | 15.0 | 7.6 | 18.0 |
| 14.4 | 16.8 | 16.0 | 18.6 | 18.8 | 18.0 | 17.4 | 16.6 | 7.8 | 18.2 |
| 13.2 | 17.4 | 15.4 | 17.2 | 18.8 | 17.2 | 18.8 | 16.6 | 7.6 | 18.6 |
| 13.1 | 15.6 | 15.4 | 16.8 | 18.2 | 16.4 | 18.8 | 17.2 | 7.6 | 17.6 |
| 13.2 | 17.2 | 16.4 | 18.4 | 18.2 | 17.0 | 17.4 | 17.4 | 7.6 | 18.4 |
| | 16.4 | | 18.4 | | | 17.4 | | 7.6 | 17.4 |
| | 17.4 | | | | | 17.0 | | 7.6 | 17.2 |
| | | | | | | 18.2 | | 7.0 | |
| | | | | | | | | 7.6 | |
| | | | | | | | | 7.6 | |
| | | | | | | | | 7.6 | |
| | | | | | | | | 7.8 | |
| | | | | | | | | 7.8 | |
| | | | | | | | | 7.8 | |
| PROM. | 13.86 | 16.85 | 15.73 | 17.70 | 18.53 | 16.96 | 18.08 | 7.62 | 17.85 |

GRAN PROMEDIO : 17.00

VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (mcg/ml) | X ² log C |
|-------|-----------|--------------------------------|-------------------------|
| A | 14.01 | 0.080 | -1.10 |
| B | 15.01 | 0.100 | -1.00 |
| C | 17.00 | 0.125 | -0.90 |
| D | 18.57 | 0.156 | -0.81 |
| E | 19.01 | 0.182 | -0.74 |
| PI | 6.70 | 0.026 | -1.71 |

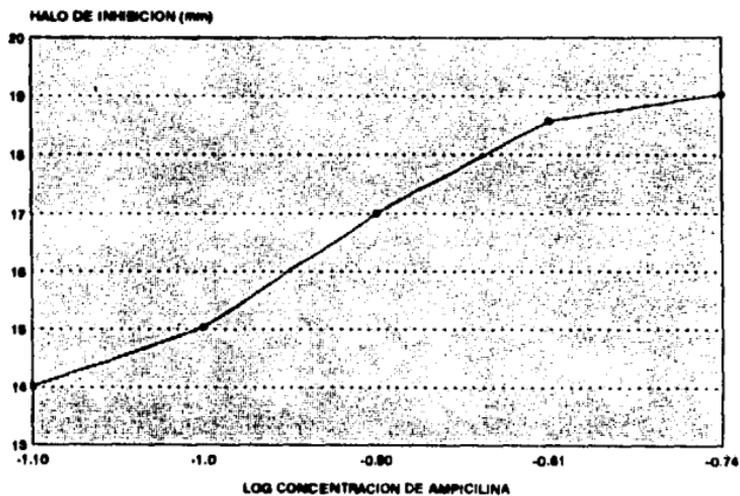
CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS:
 PI = 28.93 g / 2226 LITROS CISTERNA 1

COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.99
 PENDIENTE (m) = 14.99
 ORDENADA AL ORIGEN (b) = 30.17

DILUACION 1 / 500

ESTUDIO 9

AMPICILINA TRIHIDRATADA 0.08/0.182 mcg/ml/INACTIVACION 4 L HIPOCLORITO DE SODIO



ESTUDIO 10

VALORES DE INHIBICION EN mm OBTENIDOS EN LA INACTIVACION AL OCTAVO DIA CON 4 l DE HIPOCLORITO DE SODIO. EMPLEANDO UN ESTANUARIO DE AMPICILINA TRIHIDRATADA CONCENTRACION DE 0.08/0.182 mcg/ml.

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | P1 | PC1 | P2 | PC2 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|------|------|
| 19.4 | 18.6 | 17.6 | 18.6 | 20.0 | 18.0 | 21.8 | 18.6 | NL | 18.2 | 12.2 | 18.6 |
| 15.2 | 18.2 | 16.2 | 19.0 | 20.2 | 18.0 | 22.0 | 19.8 | NL | 18.2 | 19.6 | 16.2 |
| 15.6 | 19.0 | 15.8 | 19.6 | 19.8 | 19.0 | 20.4 | 18.8 | NL | 19.0 | NL | 19.8 |
| 16.6 | 18.0 | 17.0 | 18.0 | 19.6 | 18.4 | 21.8 | 18.8 | NL | 19.4 | NL | 18.6 |
| 15.6 | 18.4 | 17.2 | 18.8 | 20.8 | 18.6 | 21.2 | 18.2 | NL | | 25.4 | 19.0 |
| 16.0 | 18.8 | 17.0 | 18.4 | 19.6 | 19.0 | 20.2 | 18.2 | NL | | 31.6 | 18.6 |
| 15.0 | 18.8 | 16.6 | 18.2 | 19.2 | 18.6 | 22.0 | 18.4 | | | 26.6 | 18.4 |
| 15.6 | 17.6 | 16.4 | 18.6 | 19.4 | 19.6 | | 18.0 | | | 26.2 | 19.1 |
| 16.8 | 18.2 | | | | | | | NL | | | |

PROM. 15.71 16.85 19.82 21.34 18.60 28.76
 18.45 18.65 18.6 18.60 18.70 19.03

GRAN PROMEDIO : 18.57

VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (mcg/ml) | X' log C |
|-------|-----------|--------------------------------|-------------|
| A | 15.85 | 0.080 | -1.19 |
| B | 16.77 | 0.100 | -1.10 |
| C | 18.57 | 0.125 | -1.00 |
| D | 19.17 | 0.156 | -0.90 |
| E | 21.11 | 0.182 | -0.81 |
| P1 | NL | NL | NL |
| P2 | NC | NC | NC |

CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS:

P1 = NO LEIDO

P2 = NO CALCULADO

DILACION 1 / 250

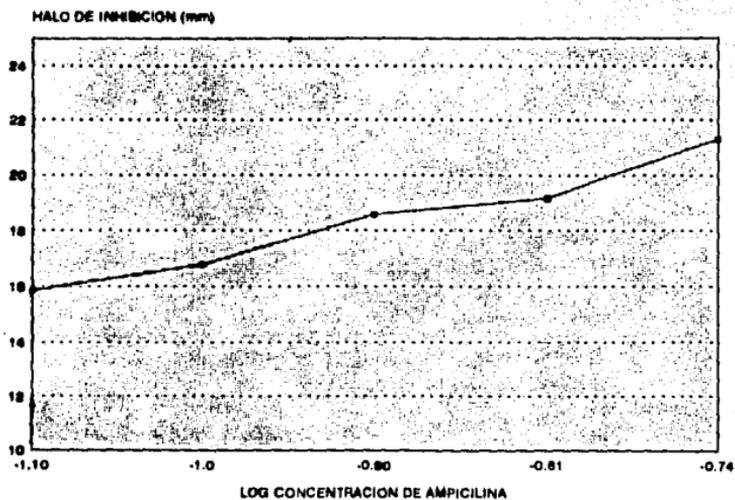
COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.978

PENDIENTE (m) = 14.47

ORDENADA AL ORIGEN (b) = 31.50

ESTUDIO 10

AMPICILINA TRIHIDRATADA 0.08/0.182 mcg/ml/INACTIVACION CON 4 L DE HIPOCLORITO DE SODIO



ESTUDIO 11

HALOS DE INHIBICION EN mm OBTENIDOS AL DOCEAVO DIA DE INACTIVACION CON 4 l DE HIPOCLORITO DE SODIO, UTILIZANDO UN ESTANDAR DE CONCENTRACION 0.08/0.182 mcg/ml. DE AMPICILINA TRIHIDRATADA.

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | P1 | PC1 |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 13.4 | 17.0 | 15.0 | 16.0 | 17.4 | 16.2 | 18.2 | 16.0 | 21.6 | 16.2 |
| 12.0 | 15.4 | 14.2 | 17.2 | 17.8 | 16.6 | 18.8 | 16.6 | 27.2 | 16.2 |
| 12.0 | 16.0 | 14.6 | 17.6 | 18.0 | 16.6 | 18.2 | 16.6 | 21.2 | 16.2 |
| 12.0 | 15.0 | 14.2 | 17.0 | 17.4 | 16.2 | 19.2 | 16.6 | 18.6 | 16.8 |
| 13.0 | 16.0 | 13.8 | 16.6 | 17.0 | 17.8 | 19.0 | 17.0 | 20.2 | 16.4 |
| 12.2 | 16.2 | 13.6 | 17.0 | 17.0 | 16.0 | 18.2 | 16.4 | 24.8 | 16.0 |
| 12.4 | | 14.8 | | 17.6 | | | | 24.0 | 16.4 |
| 15.6 | | 14.0 | | 18.4 | | | | 27.2 | 17.6 |
| | | | | | | | | 25.6 | 16.4 |
| | | | | | | | | 25.6 | 16.2 |
| | | | | | | | | 35.4 | 16.2 |
| | | | | | | | | 26.6 | 16.2 |
| | | | | | | | | 20.0 | 16.4 |
| | | | | | | | | 19.8 | |
| | | | | | | | | 21.8 | |
| | | | | | | | | 23.6 | |
| | | | | | | | | 24.6 | |

PROM. 12.82 16.26 14.27 16.90 17.57 16.5 18.60 16.53 23.25 16.40

GRAN PROMEDIO : 16.54

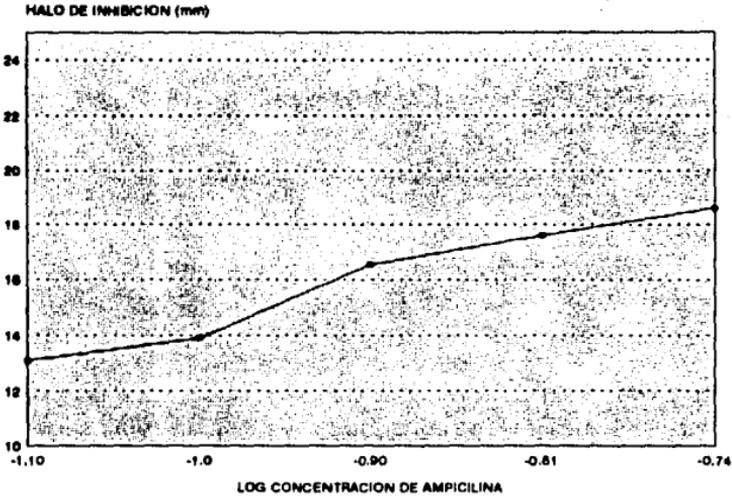
VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | y (mm) | X CONCENTRACION (mcg/ml) | X' log C |
|-------|-----------|--------------------------------|-------------|
| A | 13.10 | 0.080 | -1.10 |
| H | 13.91 | 0.100 | -1.00 |
| C | 16.54 | 0.125 | -0.90 |
| D | 17.61 | 0.156 | -0.81 |
| E | 18.61 | 0.182 | -0.74 |
| P1 | 23.19 | 0.298 | -0.52 |

CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS:
 P1 NO LEIDO EN LA CURVA ESTANDAR. FUERA DE RANGO. COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.98
 PENDIENTE (m) = 14.21
 ORDENADA AL ORIGEN (b) = 10.71
 DILUACION 1 / 500

ESTUDIO 11

AMPICILINA TRIHIDRATADA 0.06/0.182 mcg/ml/INACTIVACION CON 4 L DE HIPOCLORITO DE SODIO



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

ESTUDIO 12

VALORES DE INHIBICION EN mm DE LA INACTIVACION CON UN VOLUMEN DE 8 LITROS DE HIPOCLORITO DE SODIO AL 10.95. CONCENTRACION DE LA CURVA 0.08/0.182 mcq/ml. AL TERCER DIA DE INACTIVACION.

| A | CA | B | CB | D | CD | E | CE | P1 | PCI |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 14.8 | 17.8 | 15.1 | 17.2 | 17.5 | 16.5 | 20.0 | 17.4 | 7.5 | 18.2 |
| 15.5 | 16.4 | 16.2 | 18.0 | 18.6 | 16.0 | 19.4 | 17.2 | 8.0 | 17.2 |
| 14.8 | 16.6 | 15.8 | 17.5 | 18.4 | 17.4 | 19.6 | 17.2 | 7.5 | 19.0 |
| 14.2 | 17.2 | 16.2 | 18.0 | 18.4 | 17.4 | 19.8 | 16.2 | 8.0 | 17.0 |
| 15.0 | 17.6 | 15.4 | 17.2 | 18.8 | 16.8 | 19.8 | 17.0 | 8.8 | 18.0 |
| 15.4 | 17.2 | 16.4 | 18.2 | 17.2 | 17.8 | 20.2 | | 7.2 | 17.4 |
| 14.2 | 17.2 | 16.4 | 17.6 | 17.8 | | | | 8.2 | 17.6 |
| | | 14.8 | | | | | | 8.0 | 17.4 |
| | | 15.8 | | | | | | 10.0 | 17.6 |
| | | | | | | | | 7.8 | 18.4 |
| | | | | | | | | 8.4 | 17.6 |
| | | | | | | | | 7.8 | 18.0 |
| | | | | | | | | 8.6 | |
| | | | | | | | | 8.2 | |
| | | | | | | | | 8.2 | |

PRON. 14.74 16.15 18.11 19.80 8.1

 17.14 17.60 17.00 17.00 17.66

GRAN PROMEDIO : 17.18

VALORES AJUSTADOS

| PUNTO | Y (mm) | X CONCENTRACION (C) | X' log C |
|-------|-----------|------------------------|-------------|
| A | 14.52 | 0.080 | -1.10 |
| B | 15.73 | 0.100 | -1.00 |
| C | 17.18 | 0.125 | -0.90 |
| D | 18.29 | 0.156 | -0.81 |
| E | 19.18 | 0.182 | -0.74 |
| P1 | 7.62 | 0.021 | -1.55 |

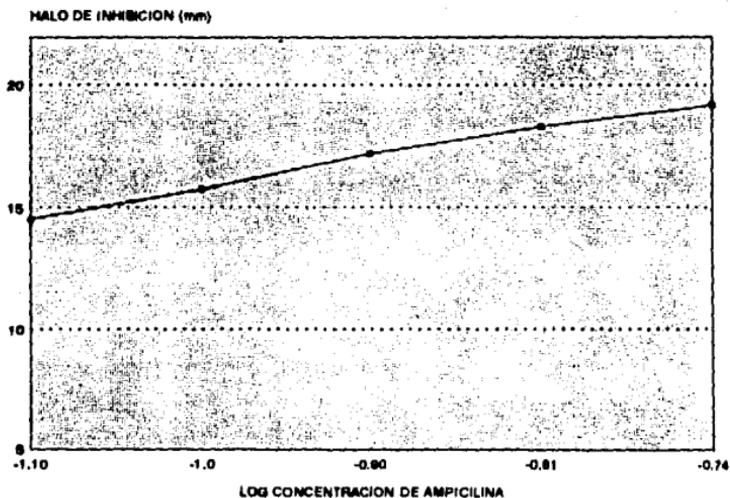
CONCENTRACION DE LOS PROBLEMAS:
P1 = 25.30 g/2225 LITROS CISTERNA 1

COEFICIENTE DE CORRELACION (R) = 0.99
PENDIENTE (m) = 13.06
ORDENADA AL ORIGEN (b) = 28.86

DILUICION 1 / 500

ESTUDIO 12

AMPICILINA TRIHIDRATADA 0.08/0.162 mcg/ml/INACTIVACION CON 8 L DE HIPOCLORITO DE SODIO



6. DETERMINACION DEL HIPOCLORITO RESIDUAL EN LAS MUESTRAS INACTIVADAS.

TABLA II. Análisis de 3 muestras de agua residual después de la inactivación.

| Muestra | Vol. de Na ₂ S ₂ O ₈ 0.001N Cons (ml) | NaClO residual (mg) |
|---------|--|---------------------|
| 1 | 0.5 | 0.016 |
| 2 | 0.3 | 0.011 |
| 3 | 0.3 | 0.011 |

VII. ANALISIS DE RESULTADOS

VII. ANALISIS DE RESULTADOS.

1. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS DE INACTIVACION .

Para determinar la proporción de reacción entre el hipoclorito de sodio y el antibiótico fue necesario hacer varios estudios preliminares. En un estudio inicial se realizó una prueba con 20 ml de solución de hipoclorito de sodio al 1.2 % (v/v) y 4 ml de solución de prueba de cefamezin $5 \times 10^{-3} \text{ M}^{(19)}$. Este primer estudio determinó que la cantidad de hipoclorito de sodio era excesiva por lo cual no permitió cuantificar la proporción de reacción.

En otro estudio se mezclaron volúmenes iguales de los componentes mencionados en el estudio inicial. Este estudio dió la pauta para determinar la metodología que se expone en este trabajo, con la diferencia de que la solución empleada contenía un solo antibiótico, posteriormente se utilizó una mezcla de cefizóx, cefamezin, ampicilina y amoxicilina. En los resultados que se ilustran en la tabla 1 se observa que para inactivar 10 mg de mezcla de antibióticos en solución se requieren en promedio 23.2 mg de hipoclorito de sodio, teniendo una relación aproximada de reacción de 1:2.

Los mismos estudios preliminares determinaron que el tiempo de reacción entre el hipoclorito de sodio y el antibiótico era de 15 min. teniendo como referencia los siguientes puntos:

-Al adicionar el hipoclorito a la mezcla de antibióticos, ésta adquiría color amarillo, al mismo tiempo, el pH se incrementaba hasta ser alcalino (12-13). El color y el

pH cambian después de aproximadamente 10 min, a verde opaco y neutro, respectivamente. En la determinación de la cantidad necesaria para inactivar el antibiótico en solución (mezcla) con hipoclorito se realizó el siguiente análisis:

- La cantidad de hipoclorito de sodio adicionada (66.21 mg) se tomó como la cantidad total (Ci) en la mezcla de antibióticos.

-El hipoclorito cuantificado en cada una de las muestras que contenían antibiótico se consideró como residual, es decir, no reaccionó con el antibiótico presente (Cr).

-La cantidad de hipoclorito total menos la residual, fue tomada como la necesaria para consumir todo el antibiótico presente en las muestras analizadas ($Ci - Cr = Crx$).

2. INACTIVACION DE LA POTENCIA BIOLOGICA DE ANTIBIOTICOS, CON MEZCLAS Y AMPICILINA.

2.1. Discusión de las curvas de potencia microbiológica.

En los estudios 1 y 2 se tomó como referencia la curva estándar, utilizada por el departamento de microbiología del laboratorio donde se realizó este trabajo, para la determinación de potencia microbiológica a los antibióticos. Inicialmente se empleó una mezcla de cuatro antibióticos: cefamezin frasco vial de un gramo, cefizóx frasco vial de 1g, amoxicilina patrón secundario y ampicilina materia prima.

Como se observa en las tablas y en las gráficas de los estudios 1,2 el coeficiente de correlación lineal esté por debajo de 0.98 , siendo de 0.87 y 0.24 respectivamente, estos valores indican una respuesta no lineal entre la dosis y la respuesta dada por el microorganismo, ésto debido probablemente a una baja sensibilidad de la *S. luteus* a la transmitancia empleada, por lo que se decidió trabajar a diferentes concentraciones de inóculo. En los estudios 1 y 2 se trabajó con un inóculo al 1.2 % de transmitancia.

Se evaluó la concentración de antibiótico activo en los estudios 1 y 2 en las muestras tomadas de la cisterna en una dilución 1/1000, la concentración obtenida fue de 267.12 , 281.28 y 69.0 , 64.55 respectivamente, en un volumen de 2226 litros que contenían las cisternas 1 y 2 . Concentración que debe tomarse con reserva dado que las curvas no son lineales.

En los estudios 3 y 4 se probó el microorganismo a una menor concentración, tratando de aumentar su sensibilidad. Los resultados muestran una mala correlación lineal entre la dosis-respuesta. La correlación lineal para estos dos estudios fue de 0.24 y 0.91 respectivamente. También se evaluó en estos dos estudios la concentración de las muestras tomadas de las cisternas, la cual, como se muestra en los resultados, es variable debido a que las dos curvas no tienen un comportamiento lineal.

El estudio 5 representa el último estudio con mezclas y del cual se observan los mismos resultados que en los anteriores estudios con mezclas. La correlación lineal de este estudio es de 0.76 y una concentración en las muestras de 97.94 y 89.04/2226 litros por cisterna.

Las posibles causas de que el trabajo con mezclas no haya proporcionado resultados satisfactorios son: La falta de control en el tiempo de inoculación, ya que las primeras cajas inoculadas (orden alfabético) se mantuvieron un mayor tiempo con la muestra por lo que pudo haber un mayor halo de inhibición, que igualó el efecto de las concentraciones D y E, no encontrándose una diferencia entre los diferentes niveles.

La inhibición del crecimiento microbiano es un fenómeno netamente de difusión, este fenómeno se pudo haber manifestado de acuerdo a lo siguiente: los antibióticos probados tiene un núcleo similar, esto les confiere algunas propiedades químicas y físicas similares, sin embargo, los grupos que se unen al núcleo son diferentes, por lo que le proporcionarán propiedades específicas a cada antibiótico. Una de estas propiedades es la polaridad que se relaciona con la "difusión", la cual será modificada cuando los antibióticos se encuentren en mezcla, manifestándose éste en el medio de cultivo con halos de difusión no uniformes.

En el estudio 6 se probó una curva empleando únicamente ampicilina trihidratada en un intervalo de concentración de 0.1- 0.2 mcg/ml. También, en el estudio 6, se procedió a adicionar a la cisterna 4.5 litros de hipoclorito de sodio al 11.7%, esta cantidad se calculó en base a la relación que se encontró de las cantidades reaccionantes de hipoclorito de sodio y la mezcla de antibióticos que fue de 23.03 mg contra 10 mg, respectivamente. La concentración de antibiótico activo en la cisterna que se tomó como base fue la de el estudio 4 con mezclas (155.8g), ya que fue la que presentó un mejor coeficiente de regresión lineal. Así, para 155.8g de antibiótico activo se requieren 3 litros de hipoclorito de sodio al 11.7%, por lo cual se agregaron a la cisterna 4.5 litros de hipoclorito de sodio,

con un exceso 1.5 litros.

Como ya se mencionó anteriormente sólo se utilizó ampicilina como estándar y no la mezcla como se había hecho anteriormente, sin embargo este estudio tampoco fue satisfactorio debido a que el coeficiente de correlación lineal es de 0.52 en el rango de concentración utilizado.

En el estudio 7 se probó otra curva utilizando únicamente ampicilina trihidratada en un rango de concentración de 0.08-0.182 mcg/ml y una transmitancia de la suspensión del microorganismo de 1.3-2.3 % . El coeficiente de correlación lineal obtenido fue de 0.99, ésto indica que existe una respuesta lineal entre la dosis y la inhibición del microorganismo en este rango de concentración . Así pues, en lo sucesivo se utilizará esta curva para evaluar la inactivación, misma que se muestra en el estudio 7.

En el estudio 8 se evaluó el contenido de antibiótico activo, una vez que se encontró una respuesta lineal en la curva (estudio 7). Se evaluó el contenido de antibiótico de la cisterna número 1 en 5 diferentes días consecutivos. La concentración más alta que se encontró corresponde al día 01.12.94 con 769.08 g/ 2226 litros, ésto se debe probablemente a que el día 27 y 28 de noviembre se llenó frasco vial, cápsulas y suspensión, por lo que, el antibiótico se pudo haber acumulado como resultado de todas las maniobras de limpieza, tanto del área como del equipo. Posteriormente, disminuyó la cantidad de antibiótico encontrada hasta 51.19 g/2226 litros el día 02.12.93, siendo la concentración más baja que se encontró durante el estudio.

En el estudio 8 se tomó en cuenta la concentración más alta que de antibiótico activo podía determinarse en la curva, para proponer una cantidad de agente inactivante. La concentración fue de 139.12 g/2226 litros que correspondió al día 04.12.93. Para inactivar esta cantidad de antibiótico activo se requirieron de 3 litros de hipoclorito de sodio al 10.9 % . Así pues, a la cisterna se le adicionaron 4 litros de agente inactivante por día (con un exceso de 1 litro). No se consideró la concentración del día 01.12.93 debido a que se salió del intervalo de linealidad de la curva. Otro motivo por el cual, se tomó en cuenta la cantidad de antibiótico activo del día 04.12.93 es por que fue la última descarga realizada.

El estudio 9 muestra los resultados después de la inactivación con 4 litros diarios de hipoclorito de sodio al 10.9 % . Se inactivaron los días 16,17,19,21,22 de diciembre de 1993 la inactivación se evaluó el día 22.12.93 .

En el estudio 9 se logró la inactivación debido a que los halos de inhibición obtenidos son producidos a la inmersión del cilindro en la placa de agar y no al efecto del antibiótico activo.

En el estudio 10 se presenta el resultado de la inactivación efectuada el día 23.12.93, en el cual se observa que no se logró la inactivación, ya que se encontraron cantidades elevadas de antibiótico activo y no fue posible calcular la concentración a través de la curva estándar. El aumento se debe probablemente al incremento de la descarga de antibióticos en la cisternas. Se continuó la inactivación con 4 litros diarios de hipoclorito de sodio al 10.9 % , y se realizó otra evaluación de la inactivación, la cual se muestra en el estudio 11.

En el estudio 11 se muestran los resultados de la inactivación del 23 al 28 de diciembre de 1993 . El estudio se realizó el día 29.12.93 y en el tampoco se logró la inactivación con los 4 litros de hipoclorito de sodio diarios . Inicialmente se pensó que se podría deber a un exceso de hipoclorito en la cisterna el cual produciría un efecto bactericida sobre el microorganismo de prueba . Para descartar esta posibilidad se realizó una valoración de las muestras con tiosulfato de sodio dando un resultado negativo en cuanto a la presencia de hipoclorito residual. A las muestras se les agregaron unas gotas de hipoclorito de sodio, éstas se tornaron de color amarillo, lo cual indicó que se trataba de antibiótico residual. Se pensó lo anterior debido a que en pruebas de laboratorio, al agregar hipoclorito a una solución de antibiótico, ésta se tornaba de color amarillo.

A partir de los resultados del estudio 11 se decidió duplicar la cantidad de hipoclorito de sodio.

En el estudio 12 se muestra el resultado de la inactivación con 8 litros de hipoclorito de sodio al 10.9 %. En el cual se observa que la inactivación fue efectiva, ya que los halos de inhibición son pequeños y se deben a la inmersión de los cilindros en la capa de agar.

Los halos de inhibición obtenidos en el estudio 12 pueden ser apreciados en el anexo 1 en el cual se observa la gran diferencia de los halos de inhibición entre las concentraciones de la curva y las muestras evaluadas de la cisterna .

Con los antecedentes de los estudios 7,8,9,10,11 y 12 se tratará de automatizar la inactivación con 8 litros diarios de hipoclorito de sodio.

3. DETERMINACION DEL HIPOCLORITO RESIDUAL DESPUES DE LA INACTIVACION.

Se evaluaron 3 muestras tomadas de las cisterna, con la finalidad de cuantificar el posible hipoclorito residual después de la inactivación con 8 litros de hipoclorito de sodio. Esto es importante debido a que podría interferir en el ensayo microbiológico, como lo ilustra Aparicio y colaboradores al verificar la actividad bactericida en *S. aureus* ⁽²⁰⁾. Los resultados de la tabla II muestran que el hipoclorito residual fue mínimo, encontrándose como máximo 0.016 mg .

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES.

1. En los estudios realizados con mezclas de antibióticos se utilizó como microorganismo de prueba *S. luteus*, determinándose que este microorganismo no es susceptible a ser utilizado en la evaluación de mezclas ya que no se obtuvieron resultados reproducibles en cada uno de los estudios realizados.

2. De acuerdo a los estudios efectuados en la determinación de la cantidad necesaria de hipoclorito de sodio para inactivar el antibiótico activo, se encontró, que para 10 mg de antibiótico activo se requieren 23.3 mg de hipoclorito de sodio. De acuerdo a esto no es aplicable lo que se mencionó en la hipótesis debido a que no es factible proponer una concentración de hipoclorito de sodio sin antes determinar la proporción de reacción.

3. Las curvas, en donde se utilizó ampicilina trihidratada como patrón, proporcionaron buenos resultados en cuanto a la linealidad observada a una concentración de 0.08 - 0.182 mcg/ml, siendo, en este rango, adecuada para determinar la concentración de antibiótico activo en la cisterna.

4. En la determinación del patrón de descarga de antibiótico activo sobre la cisterna de tratamiento, evaluada en 5 días, se encontró que la concentración máxima encontrada es de 769.08 g/2226 l, el promedio es de 302.4 g/2226 l y el mínimo es de 51.19 g/2226 l. Con la limitante de que la concentración máxima reportada es relativa debido a que ésta no se encontraba dentro del intervalo lineal de la curva patrón. Con este rango de concentraciones, la cantidad de hipoclorito necesaria es de 4-8 litros (en concentración 10.9 %), dependiendo de la carga de trabajo de la planta de antibióticos.

IX. SUGERENCIAS

IX. SUGERENCIAS.

1. Realizar nuevamente la evaluación de la potencia microbiológica de mezclas utilizando otro microorganismo de prueba, por ejemplo esporas de *B. subtilis* a una concentración de esporas al 10 % de transmitancia⁽²¹⁾. Este microorganismo también es utilizado para cuantificar β -lactámicos⁽²¹⁾.

Se debe probar inicialmente la sensibilidad del microorganismo a cada uno de los antibióticos mediante un antibiograma, con el fin de asegurarse que el microorganismo es sensible a los 4 antibióticos (cefizóx, cefamezin, ampicilina y amoxicilina).

2. Cuantificar, por un tiempo más prolongado, el antibiótico descargado por la planta a la cisterna de tratamiento, con la finalidad de tener un dato preciso de la cantidad de antibiótico activo descargada. Se recomiendan principalmente diciembre y enero debido a que en estos meses se incrementa la producción de la planta.

3. Realizar pruebas de potencia microbiológica con un placebo, utilizando agua residual, con la finalidad de ver el efecto de otros componentes contenidos en el agua residual sobre los antibióticos y sobre el microorganismo de prueba.

4. Realizar una caracterización de las aguas residuales antes y después de la inactivación, con el fin de observar el efecto que produce el hipoclorito de sodio en las propiedades de las aguas residuales.

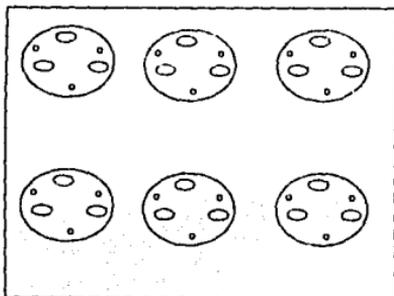
5. Identificar, por técnicas espectrofotométricas o cromatográficas, los productos de degradación de los antibióticos estudiados en este trabajo ^(13,15)

6. Debido a la falta de tiempo en la realización del proyecto no se pudo llegar al automatización del sistema de tratamiento por lo que se hace la siguiente recomendación para la automatización de la inactivación en las cisterna de tratamiento, en el anexo 2 se plantea un sistema para estos fines. En este mismo anexo se ilustra la cisterna de tratamiento, el diseño del sistema de tratamiento y la red de distribución de drenaje de la planta de antibióticos.

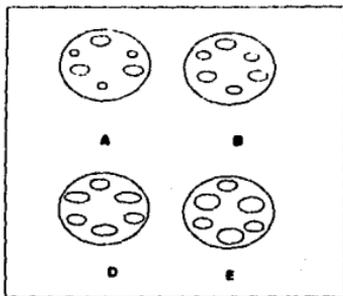
ANEXOS

ANEXO 1

VERIFICACION DE LA INACTIVACION



MUESTRAS DE LA CISTERNA Y NIVEL
"C".

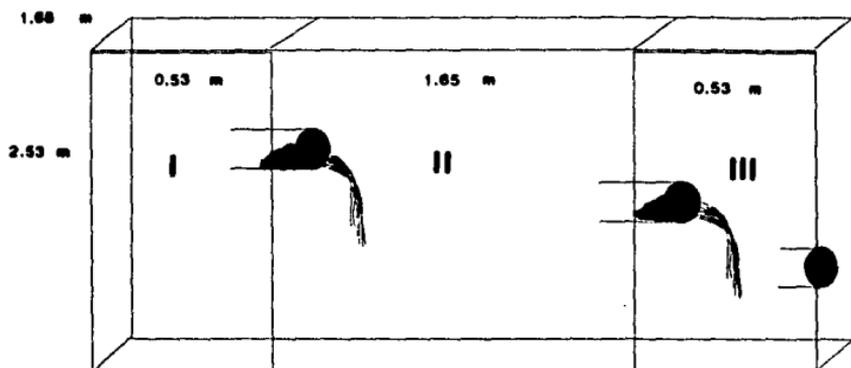


ESTANDARES A,B,C,D Y E

ANEXO II

DESCRIPCION DE LA CISTERNA.

a) El sistema de tratamiento cuenta actualmente con una cisterna dividida en tres compartimentos de acuerdo a la siguiente figura.



Cisterna de tratamiento de agua residual de la planta de antibióticos

Como se observa en la figura, la intercomunicación entre los tres compartimentos es por subniveles. Los compartimentos I y III contienen una puerta como acceso en tanto que el compartimento II no la tiene, por lo que será necesario abrir una puerta para realizar la limpieza a los tres depósitos.

DESCRIPCION DE LA AUTOMATIZACION.

A continuación se describirá el proceso de automatización del sistema de tratamiento.

El sistema se compone de un tanque de almacenamiento y dosificación de hipoclorito de sodio, bomba dosificadora y una línea de aire comprimido.

El tanque y la bomba dosificadora, así como la alimentación de aire comprimido, se situarán en la parte superior de la planta, en el área de energías y servicios. En el área de servicios se instalarán dos tuberías de PVC las cuales bajarán al compartimento I de la cisterna de tratamiento. Una de estas tuberías o líneas se utilizará para suministrar aire comprimido, ésto ayudará a homogenizar el contenido de la cisterna, además colaborará con la inactivación por la aereación de las aguas residuales. La otra línea dosificará el hipoclorito de sodio al mismo compartimento.

En el área de servicios la bomba dosificadora de hipoclorito de sodio suministrará al compartimento I hipoclorito de sodio, al mismo tiempo se inyectará aire comprimido. Se propone un sistema conjunto accionado por una válvula solenoide que al momento de dosificar suministre aire comprimido a las aguas almacenadas en el compartimento I.

A continuación se describen las características de la bomba .

- Bomba de caudal.**
- Marca: MILTON ROY**

- Tipo: Macroy
- Modelo: M110-1-A02
- Capacidad máxima: 2.6 l/h
- Presión máxima de descarga : 155 psi
- Elevación máx. de succión : 1.2 m
- Diámetro de la tubería de succión y descarga: 1/8 "
- La bomba contiene un diafragma y una bola tipo check en la succión y descarga.

El material de construcción: El extremo que tiene contacto con el líquido es de PVC. Bola check Pyrex, fuelle de hypalon, diafragma de teflón, resorte de contrapresión de Alloy "C".

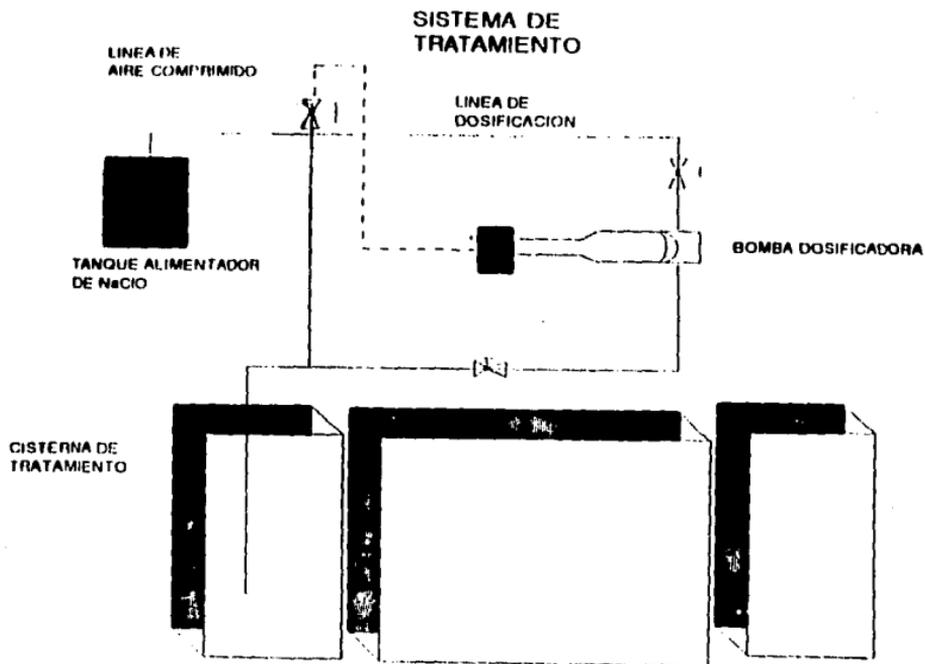
Todos los materiales son resistentes a la corrosión ocasionada por hipoclorito de sodio.

Para la dosificación, se ajusta la bomba intermitentemente a 0.250 l cada 15 min, a lo largo del turno de trabajo de 8 horas. El encendido y apagado se efectuará por el personal que destine el responsable de la planta de antibióticos.

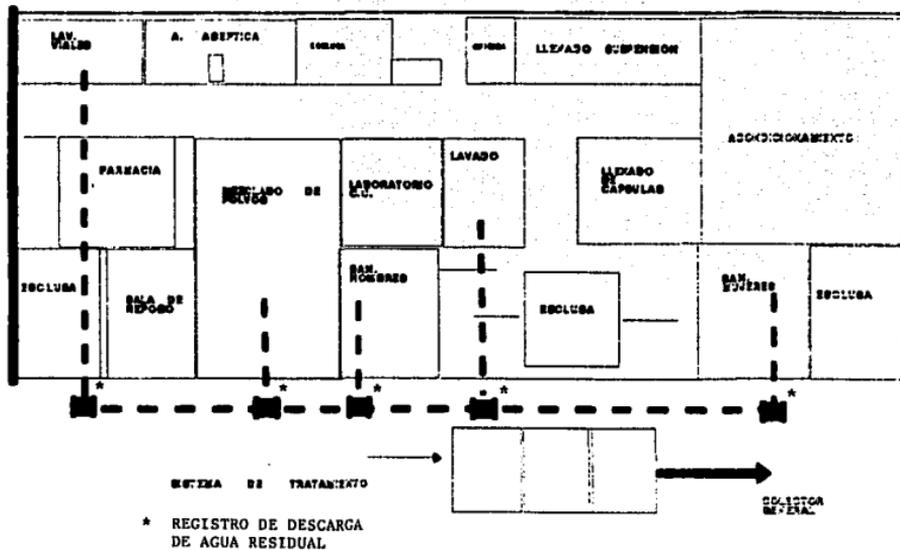
NOTA: La instalación de la línea de aire comprimido y sitio de la bomba, será determinado por el departamento de mantenimiento ya que no deberá afectar el funcionamiento normal de la planta. Antes de arrancar el sistema automáticamente se deberán lavar las cisternas.

En el siguiente esquema se presenta el diseño de la instalación de la cisterna de tratamiento para la inactivación de antibióticos.

ESQUEMA DEL SISTEMA DE TRATAMIENTO DE LA PLANTA DE ANTIBIOTICOS BETA LACTAMICOS.



ESQUEMA DE LA RED DE DESAGÜEGOS DE DRENAJE EN LA PLANTA DE LABORATORIOS.



X. BIBLIOGRAFIA

X. BIBLIOGRAFIA.

- 1. Ramalho, R. "Tratamiento de aguas residuales". España: Ed Reverte, 1991: 1**
- 2. Quadri de la Torre G. "Aguas Residuales de la zona metropolitana de la ciudad de México, impactos y perspectivas". México: Departamento Distrito Federal , 1989: 59,60,61,82,87,88.**
- 3. García J. et al. "Análisis microbiológico de aguas aspectos aplicados". España: Ed Omega, 1979:1,2.**
- 4. The National Formulary. "The United States pharmacopela". 21a. ed. USA :United States pharmacopeial convention,1990: 1261, 1502-1511.**
- 5. Hakimipour F. "Penicillin decontamination for pharmaceutical manufacturing facility" . Pharmaceutical Technology. USA ,1984 :8,6 : 88-91.**
- 6. Veiga A. M. "Producción de antibióticos por fermentación". Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico,1988, 16.**
- 7. Goodman, Gilman. "Bases farmacológicas de la terapéutica", 5a ed, México: Ed Interamericana, 1978: 914-917.**
- 8. Rose H.A. "Microbiología química". 2a ed, España ;Ed Alhambra ,1977: 36-50.**

- 9. La Prensa Médica Mexicana. "Farmacología médica Dill". 2a ed, México: , 1978:1659-1661.**
- 10. Hou, J.P, Pand, J. W Poule. "Beta lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure". J Phar Sci. USA:1971:60:4:503-512 .**
- 11. De la Cruz GR, Jaimes Ec. "Análisis de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos". Infectología, México:1981.**
- 12. Florey et, al . "Analytical profiles of drug substances" . USA : Academic Press,vol. 1 y 7 :1972:262-268, 4-47.**
- 13. Barry L.A . "The antimicrobial susceptibility test: Principles and practices". USA:Lea Febiger,1976:163-179.**
- 14. William H. "Microbiological assay and introduction to quantitative principles on evaluation".USA:Academic Press,1977:2:17-25.**
- 15. Yoshiro N. "Degradation kinetics and mechanisms of a new cephalosporin, Cefixime, in aqueous solution". J Phar Sci. USA: 1987:76:8: 208-214.**
- 16. Florey, Abraham, Chain. "Antibiotics". Great Britaing: Oxford University Press, 1949: Vol II :769-782.**

17. Saldaña M. A. "Comparación estadística de métodos microbiológicos para determinación de potencia de ampicilina". Tesis: UNAM, 1989: 5-26.

18. Finhot G J and Kristiansen H. "Catalytic Effect of buffer on degradation of penicillin G in aqueous solution". J. Pharm Sci. USA 1965: 54: 387-392.

19. Tsukinaka Y , Akiratsuy . "Comparative stability of cephalosporin in aqueous solution; Kinetics and mechanisms of degradation". J Pharm Sci. USA , 1977: 65: 17: 503-12 .

20. G.O Aparicio, Avilés Jiménez F, Rivas R.M, Osorio C.L. "Estudios de dos métodos para evaluar la actividad desinfectante del hipoclorito de sodio *S. aureus*". Bioquímica. México, 1993: 18: 1: 43-47.

21. Fujisawa Pharmaceutical Co. "Specification for testing ceftiozime sodium". Osaka-Japon: 1984.

22. Flores S M. "Control ambiental de antibióticos beta-lactámicos en una planta Farmacéutica". Tesis: UNAM, 1991 .

23. Remo B. M. "Antibióticos" . 4a ed. Argentina : Iberoamericana: 986: 32-35.

24. Bernard D. D. "Microbiology". 3er ed. USA Harper Row Publisher, 1980: 118.

25. Kavanagh F. "Analytical microbiology". USA. Academic Press, 963: 2-55.

**26. Herrera D.M, Estrada A. J. "Anteproyecto de una planta de hipoclorito de sodio partir de agua del mar por medio de una celda electrolítica".
Tesis:UNAM,1993:11-15.**