



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROPUESTA PARA EVALUAR LA EFICACIA DEL SISTEMA DE CONTROL DE LA CONTAMINACION DE UNA PLANTA PRODUCTORA DE ANTIBIOTICOS BETALACTAMICOS INYECTABLES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

EDUARDO VARGAS ALTAMIRANO

299060



MEXICO, D. F.



2001

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

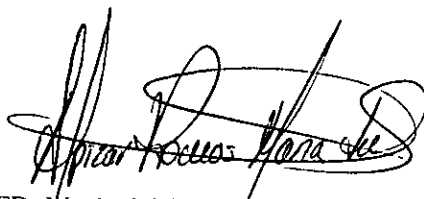
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. María del Socorro Alpizar Ramos
Vocal	Prof. Samuel Enoch Estrada Soto
Secretario	Prof. Juana Vázquez Ocampo
1er Suplente	Prof. Joaquín González Robledo
2do Suplente	Prof. Raúl Lugo Villegas

Sitio donde se desarrolló el tema:
Laboratorios ICN Farmacéutica SA de CV
Bibliotecas de la Facultad de Química.



QFB. María del Socorro Alpizar Ramos
Asesor del tema



Eduardo Vargas Altamirano
Sustentante

CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Objetivo	3
3. Penicilinas	4
3.1 Penicilina G o Bencilpenicilina	6
3.2 Propiedades fisicoquímicas de las sales de penicilina	11
4. Métodos Analíticos para determinar Penicilina (Betaláctamicos)	13
4.1 Valoración yodométrica	13
4.2 Cromatografía	16
4.3 Métodos espectrofotométricos	19
4.4 Método Colorimétrico	22
4.5 Métodos Microbiológicos	23
4.6 Pruebas rápidas para la detección de antibióticos	26
5. Procedimiento normalizado de operación para la detección de trazas de penicilina en la planta Betalactámica	33
6. Resultados	44
7. Análisis de resultados	46
8. Conclusión y recomendaciones	48
Índice de figuras y tablas	52
9. Bibliografía	53

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por abrir sus puertas y recibirme en sus aulas para transformarme en hombre de bien.

Gracias a todos los profesores de la Facultad de Química que incondicionalmente transfieren sus conocimientos y experiencias, además de siempre fomentar ética profesional.

Agradezco especialmente a la Profesora Ma. Del Socorro Alpizar Ramos por asesorarme en la realización de este trabajo, por aquel tiempo que destino a escucharme y por las palabras de aliento que me brindo. Gracias.

Agradezco a los Laboratorios ICN Farmacéutica SA de CV la oportunidad de realizar este trabajo, especialmente a las Químicas: Elizabeth Galán y Carmen Guevara, por compartirme su experiencia laboral, sus conocimientos y su amistad incondicional, por enseñarme a emprender el vuelo en el área laboral y por enseñarme a mirar siempre de frente los retos.

DEDICATORIAS

A Dios

Por ser todo un "tipazo", por estar siempre a mi lado y por el simple hecho de darme vida y salud.

A mis Padres

Por brindarme su apoyo y confianza, por soportar mis ratos de angustia, por compartir esos momentos de alegría; a ti Papá, por la paciencia que me tuviste cuando pasabas por mi algún lado y a ti Mamá por tu apoyo para hacer de mi un profesionista. Espero no defraudarlos, los quiero mucho.

A mis Hermanos

Andrés y Juan, ambos por estar siempre conmigo, por ser mis amigos de la infancia y por ser cómplices de nuestras travesuras, gracias muchachos.

A mis sobrinos y primas:

Andrea, Ramón, Janet, Lesly y Carmela, por endulzar los momentos de estancia en casa con sus risas y juegos, gritos y peleas, gracias chiquillos.

A mi Familia

Por que a pesar de todos los retos que hemos tenido, siempre estaremos juntos.

A Roció y Rafael

Por el apoyo y los sabios consejos que he recibido de ustedes y por ser ejemplo de superación.

A todos mis amigos

Si llegó olvidar poner un nombre, creo que eso no es importante, lo importante es que sepan que siempre serán mis amigos: LariNaOH, Karla E, Mari, José, Cesia, Yu, Meli, Karina, Javier, Pili, Erasmo, Briss, Paul, "Betychica" y las "Cravis".

A Liliana

Por ser la mujer que me ha enseñado a descubrir el sentimiento llamado Amor, por tener confianza en mí, por ser la persona que me ha enseñado a cerrar los ciclos de la vida, y por el simple hecho de dejarse querer. Gracias.

1. Introducción.

Hoy día el uso de la penicilina en tratamientos de enfermedades de origen bacteriano es muy común. Aunque desde hace aproximadamente 300 años los chinos aplicaban hongos sobre heridas e infecciones de la piel; no fue sino hasta el año de 1928 en el Hospital de Santa María en Londres, el Dr. Alexander Fleming, descubre la producción de una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de bacterias Gram (+), a partir de un hongo (*Penicillium notatum*); y en el año de 1943, durante la segunda guerra mundial, dos investigadores Bioquímico Ernest Chain y Howard Florey comienzan la producción comercial de penicilina en Estados Unidos a partir de *Penicillium chrysogenum*.^(5, 16, 17, 20)

En la actualidad, desafortunadamente un amplio grupo de bacterias han desarrollado parcial o total resistencia hacia ciertos tipos de penicilinas, lo que ha favorecido el desarrollo de nuevos antibióticos derivados de la penicilina que resultan excelentes para el tratamiento de diversas enfermedades de origen bacteriano. Otro inconveniente que presenta este fármaco es el creciente número de personas que han desarrollado hipersensibilidad. A pesar de esto, la eficacia de la penicilina en un buen número de pacientes promueve o mantiene su empleo generalizado en nuestro país motivo por el cual la producción aún es amplia.

Con la finalidad de evitar una potencial contaminación cruzada y alteraciones en la salud de los consumidores, la industria químico farmacéutica cumple con las reglas de Buenas Prácticas de Fabricación (NOM-059 -SSA1-1993 y Code Federal Regulations, Title 21, Volume 4, Parts 200 to 229, FDA).^(8, 25)

Por tal razón la Secretaría de Salud realiza auditorias a la industria farmacéutica a fin de verificar que ésta cumpla con las normas de calidad en los procesos de fabricación de medicamentos, así como verificar la construcción de las instalaciones y garantizar la calidad del producto.

Adicional al problema de contaminación cruzada de medicamentos, es de vital importancia para la industria farmacéutica proteger el medio ambiente, razón por la cual, hoy día, existen normas internacionales como ISO 14000 "Administración ambiental", que no son de carácter obligatorio, sin embargo su cumplimiento favorece la comercialización de sus productos en el ámbito mundial y mejora al mismo tiempo la calidad del medio ambiente.

La expulsión de pequeñas cantidades de penicilina (conocidas como trazas) al medio ambiente por parte de la industria farmacéutica, es un factor primordial para el desencadenamiento de reacciones adversas en el ser humano (shock anafiláctico, erupción dérmica, etc.), pero en nuestro país, al igual que el resto del mundo, esta contaminación no es regulada y no existe documentación oficial para su control.^(2,3)

En relación con este último punto, el presente trabajo, plantea una propuesta para evaluar la eficacia del sistema de monitoreo encargado del control de la contaminación de tipo químico en una planta productora de antibióticos inyectables, fundamentándose en la revisión bibliográfica y en la aplicación de técnicas analíticas que permitan la evaluación oportuna y asequible para la industria, además de garantizar la calidad de sus productos y la calidad ambiental.

2. Objetivo.

- 2.1 Evaluar la pertinencia del procedimiento de monitoreo de contaminación química en una planta productora de antibióticos Betaláctamicos.

- 2.2 Proponer técnicas analíticas que permitan la identificación de trazas de penicilina, que sean oportunas y asequibles para la industria, fundamentando su aplicación.

3. Penicilinas.

El término antibiótico se emplea para englobar a penicilinas y cefalosporinas que tienen en común el anillo Betalactámico, el cual puede ser hidrolizado por algunos microorganismos capaces de sintetizar una enzima: La betalactamasa.⁽³⁾

Se conocen varias clases de penicilinas, distintas por su composición química y por su actividad. La escuela Británica designó las tres primeras, que se reconocieron con los números 1, 2 y 3, y los norteamericanos con las letras F, G y X, respectivamente. Siendo hasta ahora la más frecuente la penicilina 2 o penicilina G de los norteamericanos, con la cual se estableció la Unidad Internacional de Penicilina por acuerdo de Londres en 1944.^(21, 27)

La clasificación de las penicilinas es compleja, se clasifican según su modo de obtención: naturales, biosintéticas, semisintéticas con diferentes subgrupos o bien destacando cualidades especiales de la acción antibacteriana. Para nuestro fin las penicilinas las vamos a clasificar de la siguiente forma:^(5, 18, 19, 26)

1er grupo: Penicilina G (estándar)

2do grupo: Meticilina/Nafcilina-Isoxazolil penicilina (antiestafilocócica).

3er grupo: Ampicilina-Carbenicilina (espectro amplio)

4to grupo: Acilureido-penicilinas

5to grupo: Amidino-penicilinas

6to grupo: Temocilina.

La penicilina G o Bencilpenicilina, 1er grupo y el de mayor importancia, es producida comercialmente por los hongos *Penicillium notatum* y *Penicillium chrysogenum* aunque éstos, producen varios tipos más de penicilinas. Estos compuestos son ácidos orgánicos fuertes muy inestables, razón por la que los productos comerciales son las sales de sodio, calcio, aluminio, potasio o de Procaína.^(5, 24)

Las penicilinas son inactivas en soluciones alcalinas (hidróxido de sodio que hidroliza el anillo Betalactámico); en soluciones ácidas, agentes oxidantes y por acción del calor, por tal motivo, las sales de penicilina en solución, son inestables por pocos días, aún permaneciendo en refrigeración y a pH's menores de 5 y mayores de 8, presentan el mismo comportamiento.⁽¹⁹⁾

La estructura básica de las penicilinas es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), que consiste en un anillo de tiazolidina (grupo dimetil-cisteína) con un anillo Betalactámico condensado y un grupo carboxilo unido a un grupo amino.⁽¹⁷⁾

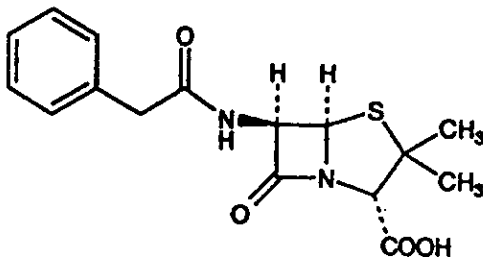


Fig.1 Estructura General Betaláctamicos.

3.1 Penicilina G o Bencilpenicilina.^(6, 7, 13, 21)

Nombre químico: [2S-(2 α , 5 α , 6 β)]-3,3-Dimetil-7-oxo-6-[(Fenilacetil)amino]-4-tia-1-azabicyclo-[3.2.0]heptano-2-ácido carboxílico.

Sinónimos: Penicilina G cristalina, Penicilina G, Penicilina, Penicilina 2, Bencilpenicilina.

Nombre comercial: Crystapen®, Falapen®, Hyasorb®, Pondets®, Solupen®, Tabilin®.

Formula Química Condensada: C₁₆H₁₈O₄N₂S

Formula Química Estructural: Ver la figura número 1, representa la estructura general de las penicilinas, el anillo 6-APA.

Peso Molecular: 334.39

Descripción: Polvo fino de color blanco a ligeramente amarillo, amorfo; estable como penicilina pura y seca.

Solubilidad: Muy soluble en agua; soluble en etanol, metanol, éter, acetato de etilo, benceno, acetona y cloroformo; insoluble en éter de petróleo.

Rotación Específica: $[\alpha]_D + 269^\circ$ (en una solución de metanol a 20°C); $[\alpha]_D + 282^\circ$ (en una solución de etanol a 20°C).

Actividad Antibiótica: 1250 UI/mg.

pH: En solución acuosa, las penicilinas presentan un valor de pH entre 5 y 7.5

Valor de pKa: 2.74 (solución acuosa a 5°C); 2.76 (solución acuosa a 25°C); 4.84 (solución etanólica 80%, 5°C).

Espectrofotometría Infrarroja (IR): A continuación se muestran algunos cromatogramas de espectrofotometría infrarroja de compuestos Betaláctámicos, como son el ácido 6 aminopenicilánico, el ácido D- Bencilpenicilínico y la sal Ampicilina Sódica. (13, 23)

La particularidad de estos cromatogramas es la presencia del registro de banda que caracteriza a la estructura del anillo Betalactámico en la longitud de onda de 1780 cm^{-1} , en una tableta de bromuro de potasio (1.2 mg en 300 mg).

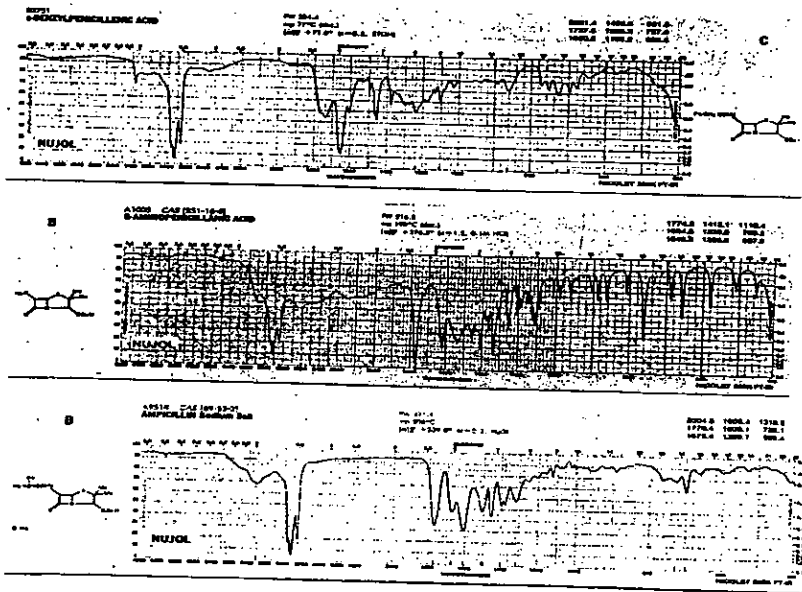


Fig. 2 Infrarrojos de Productos Betaláctámicos.

Espectrofotometría Ultra Violeta (UV): En la Figura 3, se muestra el cromatógrama de un compuesto Betalactámico (Penicilina G Benzatinica), obtenido a través de un Espectrofotómetro Zeiss®, a una longitud de onda de 263 nm.⁽¹³⁾

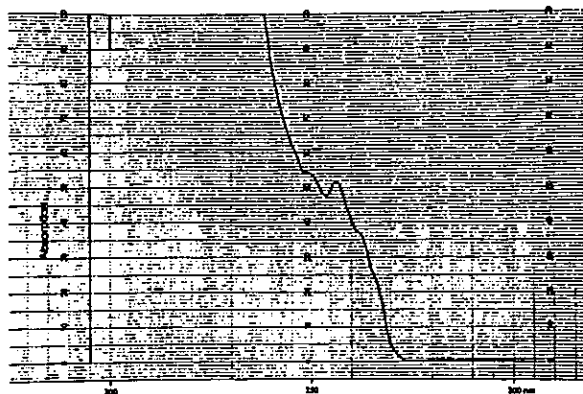


Fig. 3 Espectro UV penicilina G Benzatina

La Bencilpenicilina en solución acuosa presenta máximos de absorción alrededor de 263 nm y 280 nm, por tal motivo el cromatógrama que se observa en la figura 3, describe el comportamiento de la estructura Betalactámica.

Espectroscopía de Masas: El espectrómetro de masas produce partículas cargadas que consisten del ión progenitor y de fragmentos iónicos de la molécula original, y separa estos iones de acuerdo con su proporción de masa / carga. El siguiente ejemplo, representa el espectro de la penicilina G Benzatinica, el cual nos sirve como principio, para identificar el grupo Betalactámico. El espectro se elaboró en un equipo Varian Mat 311®, en la función de desorción (corriente de calentamiento de 10 – 20 mA).⁽¹³⁾

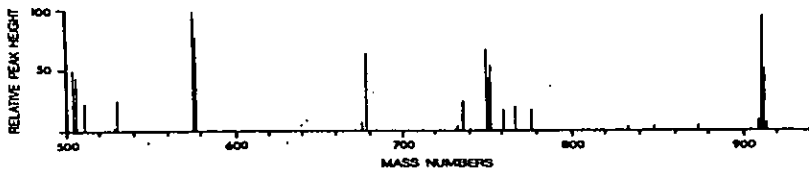


Fig. 4 Espectro de Masas penicilina G Benzatina.

Las bandas que se observan a 570 masa atómica, son atribuidas a la penicilina G + Benzatina + H⁺, y las bandas que se observan a 910 masa atómica se atribuyen a un compuesto asociado con la mezcla de penicilina G + Benzatina + H⁺.

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear Protónica: Al igual que los otros métodos antes mencionados, permite la identificación de átomos presentes en una estructura, a partir, de un cambio en la orientación del spine originado por una radiación. En la Figura 5, se presenta el espectro de la penicilina G Benzatinica, obtenido en una solución de DMF-d₇, con Tetrametil silano (TMS) como sustancia de referencia interna, utilizando un equipo de espectroscopia RMN protónica Varian EM-390® a una frecuencia de 90MHz.⁽¹³⁾

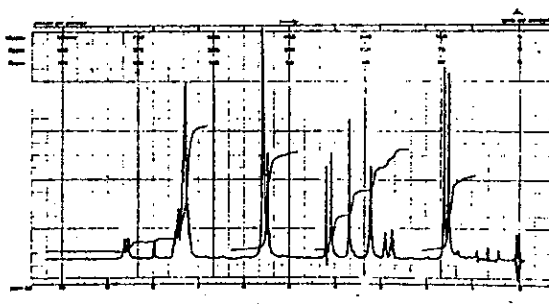


Fig. 5 Espectro de RMN protónica penicilina G Benzatina

En la siguiente tabla se muestra la interpretación del espectro RMN protónica de la Bencilpenicilina. Dependiendo de los diferentes desplazamientos químicos registrados en el espectro de RMN protónica, se sabe cual es la estructura de la penicilina que se esta analizando.

Tabla A: Interpretación RMN

Unidad relativa (ppm)	Multiplicidad	Intensidad	Átomo
8.6	d (J= 7Hz)	1H	-CO-NH-
7.3	m	10H	Fenil-H
5.6	s	6H	NH ₂ + H ₂ O
5.5	2d	2H	H ₅ , H ₆
4.2	s	1H	H ₃
4.1	s	2H	Fenil - CH ₂ -N
3.7	s	2H	Fenil-CH ₂ -CO
3.2	s	2H	N-CH ₂ -CH ₂ -N
1.6	s	3H	2β-CH ₃
1.5	s	3H	2α-CH ₃

d= doblete, s= singulete, m= multiplete, J= constante de acoplamiento

Hasta este momento, se hace mención de las características fisicoquímicas de la Bencilpenicilina, o Penicilina G; clasificada como una penicilina natural. Comercialmente no se encuentra en forma natural sino como sales de penicilina, siendo éstas las materias primas para la elaboración de la gran diversidad de marcas de antibióticos que se consumen a nivel nacional.

Ahora bien, es importante mencionar las características fisicoquímicas que presentan las sales de penicilina, aunque su comportamiento en general sea el mismo a la penicilina de origen natural, pueden presentarse variaciones por la presencia de otros átomos ó moléculas en su estructura.

3.2 Propiedades Fisicoquímicas de las sales de Penicilina.

Las sales de penicilina consideradas en el presente trabajo son: la Penicilina G Procaína, la Penicilina G Sódica y la Penicilina G Procaína Sódica 3:1, esta última, por ser la materia prima utilizada en la producción de Hidrocilina 800®, producto elaborado en los Laboratorios Farmacéuticos ICN Farmacéutica SA de CV.

En la tabla B, se describen algunas propiedades fisicoquímicas de las sales de penicilina.^(1, 6, 7, 11, 12, 13, 15, 21, 29)

Estas propiedades son consideradas como las más importantes para la elaboración de este trabajo, ya que nos permiten fundamentar la utilización de las técnicas analíticas que se emplean para la identificación de la Penicilina G, como agente contaminante.

Es necesario hacer mención de que la mezcla de penicilina G Procaína sódica 3:1, es una mezcla especial, considerada como producto no farmacopéico por lo que las especificaciones y propiedades fisicoquímicas, se basan en cálculos teóricos de composición molecular.⁽¹⁾

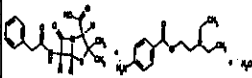
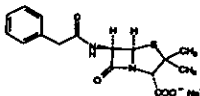
Propiedad Físico Química	Penicilina G Procaina	Penicilina G Sódica	Penicilina G Procaina Sódica 3:1
Nombre Químico	4-tia-azabicyclo-(3,2,0)heptano-2-ácido carboxílico-3,3-dimetil-7-oxo-6-((fenilacetil)amino)- (2S-(2 α ,5 α ,6 β)-, compuesto con 2-(dietilamino)etil p-aminobenzoato(1:1) monohidratado	4-tia-1-azabicyclo-(3,2,0)heptano-2-ácido carboxílico-3,3-dimetil-7-oxo-6-((fenilacetil)amino)-(2S-(2 α ,5 α ,6 β))sal monosódica	Representa una mezcla de los dos sales de penicilina por lo que su nombre químico es el nombre de cada una de las sales.
Formula Química Condensada	$C_{16}H_{18}N_2O_4S \cdot C_{13}H_{20}N_2O_2 \cdot H_2O$	$C_{16}H_{17}N_2NaO_4S$	Presenta la formula química de ambas sales.
Formula Química Estructural			Presenta la formula química estructural de ambas sales
Peso Molecular	588.72	356.38	2122.54
Descripción	Cristales de metanol-agua hemimorfos; polvo blanco cristalino, con olor característico.	Cristales de Metanol-acetato de etilo o agua-n-butanol, de color blanco, con olor característico	Polvo blanco o ligeramente amarillento, con olor característico libre de partículas extrañas
Solubilidad	Un gramo se disuelve en 250mL de agua, en 30mL de alcohol, 60mL de cloroformo.	Muy soluble en agua, solución salina isotónica y solución de glucosa; soluble en alcohol, glicerol, y otros alcoholes primarios, Prácticamente insoluble en acetona, éter, $CHCl_3$, acetato de etilo y amilo; insoluble en aceites y petrolato.	Muy soluble en agua, solución salina isotónica y solución de glucosa; soluble en alcohol, glicerol y otros alcoholes primarios; Prácticamente insoluble en acetona, éter, $CHCl_3$, acetato de etilo y amilo; insoluble en aceites y petrolato.
PH	5.0 – 7.5 en solución acuosa.	5.5 – 6.5 en solución acuosa.	5.0 – 7.5 en solución acuosa.
Densidad	1.255-1.256 g/mL	1.41 g/mL	0.30-0.40 g/mL
Rotación óptica	+ 173° (en solución de Me_2CO a 25°C).	+ 301° (en agua a 24.8°C).	No se determina.
Punto de Fusión	106-110°C	215°C	No se determina
Máximos de Absorción UV	290 nm (ϵ , 777)	252 (ϵ , 300), 258.6 (ϵ , 240) y 264.4 nm (ϵ , 180).	Entre 250 – 290 nm..
Actividad Antibiótica	1000 UI/mg	2100 UI/mg	1027 – 1082 UI/mg

Tabla B. Propiedades Físicas y Químicas de sales de penicilina.

4. Métodos Analíticos para determinar Penicilina (Betaláctamicos).

Existen gran número de métodos analíticos para la detección, cuantificación e identificación de penicilina, a continuación se mencionan algunas características y la metodología que sigue cada método.

Método Analítico	Parámetro analítico de Medición	Sensibilidad	Tiempo de Análisis	Costo
Valoración yodométrica	Cuantitativo	2000 UI/mL	360 min/ muestra	+++++
Cromatografía en capa delgada	Cualitativo o identificación	80 UI/mL	60 min/ muestra	+++
Cromatografía de alta resolución	Cuantitativo	Alta sensibilidad	17 min/ muestra	++++
Espectrofotometría UV	Cuantitativo y Cualitativo	1.2 UI/mL	30 min/ muestra	+++
Espectrofotometría IR	Cualitativo o identificación	Alta sensibilidad	15 min/ muestra	+++
Método Colorimétrico	Cualitativo o identificación	Baja sensibilidad	10 min/ muestra	++
Métodos Microbiológicos	Cuantitativos y Cualitativos	0.03 - 0.8 UI/mL	1440 min/ muestra	+++++
Charm SL Beta Lactam Test	Cuantitativo y Cualitativo	5 ppb	8 min/ muestra	+++++

Tabla C. Comparación de Métodos Analíticos para determinar trazas de penicilina.

4.1 Valoración yodométrica. La penicilina es un antibiótico que posee en su composición química un anillo Betalactámico, esta molécula como tal, no consume yodo, pero si el anillo se abre por medio de una reacción de hidrólisis alcalina o con penicilinasas, se obtiene el ácido penicilóico, molécula capaz de consumir yodo. La diferencia en el consumo de yodo antes y después de la hidrólisis es proporcional a la cantidad de antibiótico presente en la muestra. (12, 33)

Es un método cuantitativo, específico para la Penicilina G sódica y Penicilina G Procaína, su sensibilidad no es amplia (2000 UI/mL) y no se tiene documentación donde se demuestre mayor sensibilidad; su costo es elevado debido al número de

reactivos que se emplean, el tiempo de análisis que se destina a una valoración es alto, por lo que no es aplicable como primer elección, sino como método alternativo.

Para lograr resultados reproducibles es importante conceder gran atención a los detalles del procedimiento, tales como: proteger las soluciones de yodo de la luz, asegurar tiempos de reacción idénticos para el blanco y la muestra, concentración de las soluciones y pH de las mismas.

La siguiente ecuación ejemplifica la reacción que se lleva a cabo durante un ensayo yodométrico.⁽⁹⁾

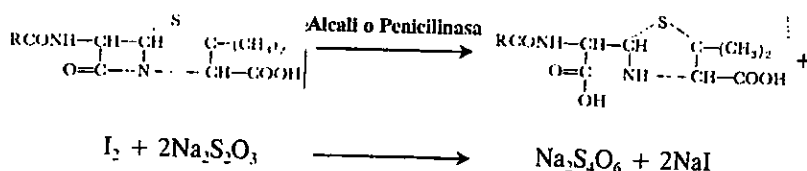


Fig. 6 Reacción de Hidrólisis, valoración Yodométrica.

El método consiste en tener una solución estándar y una solución problema, ambas a una concentración de 2000 UI/mL, disueltas en solución reguladora de fosfatos pH=6.0, cuidar mucho de ésta condición. A partir de estas soluciones se toman alícuotas de 2 mL que son depositadas en un matraz yodométrico; un matraz representa la muestra hidrolizada, y otro matraz representa un blanco; la muestra hidrolizada se trabaja de la siguiente forma: se adicionan 2 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N, y se deja reposar por 15 minutos, durante este periodo ocurre la hidrólisis alcalina, una vez transcurrido el tiempo, se adicionan

exactamente 2 mL de solución de ácido clorhídrico 1.2 N para detener la reacción de hidrólisis y obtener un valor de pH aproximado a 1.0; posteriormente se adicionan 10 mL de solución de yodo 0.01 N y se deja reposar por 15 minutos protegido de la luz, durante este período, el ácido penicilínico atrapa el yodo presente en el medio de reacción, una vez concluidos los 15 minutos, se procede a valorar con solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0.01 N el yodo que no fue atrapado por el ácido penicilínico; se utiliza como indicador solución de almidón para determinar el punto final de la valoración. Para la solución blanco, el procedimiento es el mismo sólo que, no se lleva a cabo la hidrólisis alcalina, por consiguiente el yodo que se agrega inicialmente es el yodo que se valora con la solución de tiosulfato, y el volumen consumido de éste va a ser similar al volumen de yodo que se adicionó. Efectuar el mismo procedimiento para la solución estándar de concentración similar a la muestra problema; Realizar los siguientes cálculos:

- Contenido de penicilina G sódica: Determine el factor F en unidades equivalentes a cada mL de solución 0.01N de tiosulfato de sodio consumido.

$$F = P(W_{\text{ref}} / B_{\text{ref}} - S)$$

Donde:

P es la potencia de la sustancia de referencia en U/mg

W_{ref} es el peso en miligramos de penicilina G en los 2 mL titulados

B_{ref} son los mL de solución 0.01N de tiosulfato de sodio gastados en el blanco de referencia de penicilina G

S son los mL de solución 0.01N de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la preparación de referencia de penicilina G

-
- Calcule las UI de penicilina G por mL (U):

$$U = X(Bm-M)F$$

Donde:

Bm son los mL de solución 0.01N de tiosulfato de sodio gastados en el blanco de la muestra

M son los mL de solución 0.01N de tiosulfato de sodio gastados en la titulación de la muestra

X es el factor de dilución de la muestra

Corrija el valor de penicilina G sódica restando el valor de penicilina G procaína obtenidas por el método de UV

- Contenido de penicilina G procaína: Para calcular el contenido de penicilina G total en UI/mL, sumar el valor obtenido en esta valoración, al valor obtenido en penicilina G sódica sin corrección.

4.2 Cromatografía: Método que consiste en la separación física de componentes de una mezcla y en la identificación de algunos de ellos, basado en la interacción selectiva de las especies con el sistema de separación. En el presente trabajo, se hace referencia a dos variedades, Cromatografía en capa delgada (CCD) y Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).⁽¹⁰⁾

Cromatografía capa delgada (CCD): método cualitativo en el cual los componentes de una mezcla se separan sobre una fase estacionaria (silica Gel) por donde es eluido un disolvente (fase móvil) con propiedades específicas como polaridad. Es un método bastante rápido, específico, asequible a la industria por el número reducido de materiales que se emplean, el tiempo destinado en un análisis por este método es bajo, sólo se utiliza como método de identificación, aunque puede realizarse una cuantificación. La sensibilidad del método es aproximadamente de

80 UI/ml, cualidad que permite identificar pequeñas cantidades del orden de miligramos de penicilina.⁽¹²⁾

El procedimiento es sencillo, consiste en correr en una placa de sílica gel, en carriles separados, el estándar de penicilina G sódica y penicilina G Procaína, ambas disueltas en etanol, y en otro carril aplicar la muestra a evaluar; colocar la placa en una cámara de elución previamente saturada de una mezcla de disolventes (acetona-metanol) y dejar eluir. Revelar la placa y observar las manchas obtenidas de la muestra, las cuales deben corresponder en tamaño, color y Rf a los estándares de penicilina.

Cromatografía de alta resolución (HPLC): Al igual que la CCD, la Cromatografía de alta resolución, es un método de separación e identificación cuantitativo, en donde se tiene una fase estacionaria denominada columna y una fase móvil (solvente o mezcla de solventes con polaridad conocida); sólo que a diferencia de las demás variedades de cromatografía, en éste la fase móvil es inyectada en la fase estacionaria a una presión y una velocidad de flujo tal, que permite la separación y cuantificación de los componentes de la mezcla con alta sensibilidad y especificidad, características que hacen de este método, un ideal para la determinación de pequeñas cantidades de penicilina. Es un método farmacopéico, rápido, confiable y reproducible, además de ser un método costeable a la industria.^(1, 31)

La cuantificación se lleva a cabo por comparación de las áreas de los picos de la solución problema y de la solución estándar.

El procedimiento que se sigue en HPLC es el siguiente:

Condiciones cromatográficas:

Columna HP Lichrospher 100 RP-18®, 5 micras, 250 x 4 mm.

Fase móvil de solución reguladora de fosfatos: acetonitrilo 1:1, pH 7.2.

Volumen de inyección 20 µL.

Flujo de 1.75 mL/min.

Longitud de onda 235 nm y 215 nm.

Tiempos de retención:

0.0 – 2.9 min. 235 nm

2.9 – 6.6 min. 215 nm

6.5 – 17 min. 235 nm

Tiempo aproximado de corrida 17 minutos.

Proceder a inyectar el estándar de Penicilina G Procaína y la muestra problema al cromatógrafo, los picos de la muestra deben corresponder en tiempo de retención a los picos del estándar. Realizar los siguientes cálculos:

- Pureza o potencia en U/mg.

$$(A_m/A_{st}) \times (W_{st}/W_m) \times P_{st}$$

Donde:

A_m es el área de penicilina G en la muestra

A_{st} es el área promedio de penicilina G en el estándar

W_{st} es el peso, en mg, del estándar

W_m es el peso, en mg, de la muestra

P_{st} es la pureza o potencia del estándar en U/mg

4.3 Métodos espectrofotométricos. Los métodos espectrofotométricos se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia. El espectro electromagnético (EMR) se divide en la siguiente gama de longitudes de onda: rayos gamma, rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas y ondas radioeléctricas. Las interacciones electromagnéticas con la materia provocan la absorción o emisión de energía (EMR) a través de la transición de los electrones entre niveles cuánticos o discretos de energía, vibraciones de enlace, rotaciones moleculares y transición de electrones entre orbitales de átomos y moléculas; todas estas interacciones tienen lugar en instrumentos denominados espectrómetros o espectrofotómetros. Los espectros generados en esos equipos se graban gráficamente o fotográficamente en espectrogramas o espectrógrafos, que permiten el estudio de la longitud de onda y la intensidad de la radiación absorbida o emitida por la muestra analizada.^(10,30)

La absorción espectrofotométrica en las gamas visible y ultravioleta del espectro electromagnético es un método espectral cuantitativo, común para sustancias orgánicas e inorgánicas. Con esta técnica se mide la transparencia relativa de una solución, antes y después de hacerla reaccionar con un reactivo que produce color. La disminución que se produce en la transparencia de la solución es proporcional a la concentración del compuesto analizado. Es un método sensible, cualitativo o cuantitativo según la aplicación, específico, rápido y muestra resultados en periodos cortos de tiempo.

Método de espectrofotometría UV – Visible, utilizado para cuantificar la penicilina G Procaína, es un método farmacopéico que consiste en lo siguiente:⁽¹²⁾

Se realiza una curva de calibración de Clorhidrato de Procaína USP con las siguientes concentraciones: 1.2 UI/mL, 2.4 UI/mL, 3.6 UI/mL, 4.8 UI/mL, 6.0UI/mL, cada concentración es tratada con solución de ácido clorhídrico 4 N; en periodos de 2 minutos, se adiciona 1 mL de solución de nitrito de sodio al 0.1%, 0.5 mL de solución de sulfamato de amonio al 0.5% y 1 mL de diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina al 0.1% solución, llevar al aforo con agua y obtener el valor de absorbancia en la región visible a una longitud de onda de 550 nm, utilizar una celda de 1cm y ajustar con una solución blanco, previamente tratada de igual forma. Trazar una curva con las lecturas de absorbancia contra el valor de concentración. Leer bajo las mismas condiciones la muestra e interpolar el valor de absorbancia para reportar el valor de concentración en UI/mL.

Las desventajas del método se presentan en la inestabilidad de la reacción que se lleva a cabo y de los reactivos empleados (preparar el día de uso), motivos por los cuales, no resulta confiable; presenta buena sensibilidad (1.2 UI/mL) y el tiempo de análisis empleado es corto. Clasificado como método alternativo.

Espectrofotometría de absorción infrarroja, es adecuada para análisis de compuestos orgánicos, pues los enlaces alquenos, ésteres, alcoholes y otros grupos funcionales tienen fuerzas muy diferentes y absorben la radiación de infrarrojo en una gran variedad de frecuencias o energías. Esta absorción se refleja en el espectrógrafo en forma de picos. Este método sólo es empleado para identificación,

no es recomendable para cuantificación, ya que no se obtienen picos específicos para cada componente de una mezcla, sólo se obtienen picos para grupos funcionales. Posee alta sensibilidad y especificidad para identificación además de ser un método bastante rápido.⁽³⁰⁾

Aunado a las ventajas mencionadas, el procedimiento que sigue un análisis por infrarrojo es sencillo. Existen distintas técnicas para manipular una muestra, sin embargo, la preparación de éstas, se basa en el criterio del químico, que aplicará la técnica adecuada para obtener la información deseada.

Muestras sólidas. Para las muestras sólidas existen los siguientes procedimientos:

- Obtención de película.
- Fusión o suspensión en un líquido viscoso.
- Dispersión en una pastilla de cloruro de sodio, bromuro de potasio o yoduro de cesio.

Muestras líquidas. Las muestras líquidas puras pueden prepararse de la siguiente manera:

- Preparación de Películas.
- En solución.

La mayoría de las muestras que se someten al análisis cualitativo en el infrarrojo son líquidos puros o soluciones de sólidos, líquidos y gases. Para líquidos puros, a

menudo es suficiente una gota depositada entre las celdas de NaCl, KBr o CsI, para obtener un buen espectro que permita la interpretación de los grupos funcionales.

Las principales ventajas de trabajar con soluciones, facilidad de preparación de las muestras, uniformidad de dispersión del soluto y posibilidad de fijar la concentración y espesor de la celda.

En un análisis cualitativo de trazas de penicilina, se emplea la técnica de muestras líquidas en solución, por lo que el procedimiento resulta ser bastante rápido, confiable, buena sensibilidad y especificidad, considerado como un método alternativo.

4.4 Método Colorimétrico. Existen métodos en donde, las moléculas al combinarse con otra molécula producen una coloración en el medio de reacción como ocurre en las reacciones enzimáticas. Las penicilinas también presentan una reacción colorida; basada en el vire de un indicador ácido - base (rojo neutro), después de la hidrólisis enzimática (Penicilinasas) del anillo Betalactámico presente en la estructura de la penicilina.⁽¹²⁾

Durante el análisis, el medio de reacción presenta un valor de pH=6.0, al adicionar el indicador se observa de color rojo; su rango de vire es de pH 6.8 a 8.0 (pasa de color Rojo a color Amarillo). Al agregar aproximadamente 2 gotas de una solución de hidróxido de sodio 0.1 M, se observa un vire en el color del indicador (naranja), inmediatamente después de adicionar 1 mL de solución de Penicilinasas con

1ULevi, se percibe nuevamente un vire en el medio de reacción (de color naranja a color rojo intenso); esto confirma la presencia de penicilina.

La penicilinasas, es la enzima encargada de llevar a cabo la hidrólisis del anillo Betalactámico, generando ácido penicilóico, el cual, acidifica el medio de reacción dando como resultado el vire del indicador ácido - base.

Las limitaciones de este método son: baja sensibilidad (1 mg de penicilina/mL), presencia de falsos positivos, debido a que la penicilinasas se encuentra en una solución reguladora de fosfatos pH=6.0 lo que puede generar el vire del indicador y, sólo es un método cualitativo, su principal ventaja es que puede utilizarse como prueba presuntiva para detectar presencia de trazas de penicilina.

4.5 Métodos Microbiológicos. Los métodos microbiológicos más utilizados para cuantificar la potencia de los antibióticos son: el método de cilindro placa y el método turbidimétrico. Ambos métodos están aprobados por la USP y la FEUM, para el presente trabajo, se realizan algunas modificaciones en el procedimiento de los métodos, pero éstas no afectan el fundamento de la determinación.^(12, 14, 22, 24)

Ambos métodos emplean aproximadamente 24 horas para mostrar resultados, motivo que resulta ser una limitante para su aplicación en un análisis de determinación de trazas de penicilina, ya que debe darse un resultado rápido y confiable que garantice el control en el monitoreo de la contaminación

La cantidad de material que se emplea en un análisis por ambos métodos es numeroso, y adicional a estas limitaciones, se debe contar con cepas de

microorganismos recientes. Pero no todo son desventajas, ambos métodos poseen una sensibilidad alta (0,03 UI/mL a 0.8 UI/mL cilindro placa), pueden ser utilizados cuantitativamente y/o cualitativamente, muestran resultados confiables por lo que son considerados como métodos también alternos.

El método cilindro placa: Se basa en la difusión radial del antibiótico desde un punto de aplicación, a través de una superficie de agar inoculado con un microorganismo adecuado (*Staphyococcus aureus* ATCC 6538-P, *Micrococcus luteus* ATCC 9341). Esta difusión origina zonas de inhibición de crecimiento del microorganismo, cuyo diámetro, posterior a un tratamiento estadístico, esta en función a la concentración del antibiótico.

En el método de cilindro placa se realizan diluciones de un estándar de penicilina G Potásica que representan puntos de referencia para cuantificar la concentración de penicilina que esta presente en las muestras analizadas. Estas diluciones van de una concentración de 0.03 UI/mL hasta 0.8 UI/mL (curva de estandarización) de ahí se deriva la sensibilidad del método; Con estas soluciones se llenan los cilindros de acero inoxidable que fueron previamente colocados en las cajas petrí que contienen medio Antibiótico N°11 (medio base) y medio semilla con el microorganismo de prueba (también medio Antibiótico N°11). Llenar 2 cilindros con solución estándar (punto medio de la curva de estandarización), 2 con muestra y 2 con muestra más Penicilinas, realizar por triplicado para cada muestra, incubar las cajas petrí 18 a 24 horas, medir las zonas de inhibición con ayuda de un vernier o medidor de halos para posteriormente, realizar el tratamiento estadístico

y obtener las unidades de penicilina presente en las muestras. El motivo de utilizar Penicilinasas en el método es demostrar la ausencia de agentes químicos distintos a la penicilina, responsables de inhibir el crecimiento del microorganismo prueba, por lo que, si un cilindro que contenga solución reguladora con penicilinasas y muestra problema presenta halo de inhibición, indica la presencia de un agente químico distinto al de interés. El método puede sólo ser utilizado de forma cualitativa, evitándose así, realizar diluciones del estándar de penicilina.

Se debe tener cuidado en la preparación de las diluciones del estándar, ya que representa un punto crítico en la obtención de resultados precisos y exactos. El método cilindro placa hasta hace algunos años era considerado como el método de elección para detección de trazas de penicilina, pero la tecnología ha rebasado las expectativas ya que en la actualidad se encuentran disponibles "kits" comerciales o pruebas rápidas para detección de antibióticos, las cuales desplazan poco a poco este método. No obstante algunas empresas lo siguen empleando debido a que su costo, a pesar de todas las limitaciones ya mencionadas, sigue siendo menor a un método enzimático.

El método turbidimétrico: Se realiza en un medio de cultivo líquido, previamente inoculado con el microorganismo adecuado, adicionando concentraciones crecientes del antibiótico. Después del período de incubación, se determina la turbiedad producida por el crecimiento microbiano, la cual es inversamente proporcional a la concentración del antibiótico. Este método, por experiencia propia, no es recomendable para determinar trazas de penicilina, debido a las

pequeñas concentraciones de antibiótico que se encuentra en las muestras y no se logran percibir resultados favorables.

4.6 Pruebas rápidas para la detección de antibióticos.⁽²⁸⁾

La presencia de trazas de penicilina en productos farmacéuticos representa un riesgo a la salud del consumidor; la detección oportuna de contaminación es vital en la industria farmacéutica, por lo que se han implementado técnicas analíticas para determinarla.

También en la industria alimenticia, especialmente en lácteos, detectar trazas de penicilina es importante; a diferencia de la industria farmacéutica, en lácteos la determinación de penicilina se realiza por medio de "Kits" o pruebas rápidas de laboratorio que presentan resultados confiables, y en poco tiempo (15 minutos).⁽³²⁾

Las pruebas rápidas de laboratorio se fundamentan en reacciones enzimáticas, lo cual les confiere una sensibilidad alta, aunque su costo es elevado, no es significativo por el tiempo empleado en la determinación (horas hombre invertidas y tiempo para presentar resultados), cantidad de reactivos empleados y número de determinaciones realizadas, ventajas que hacen de estos métodos los de primera elección en la determinación de trazas de penicilina en la industria farmacéutica y alimentaria.

Comercialmente existen pruebas como: prueba SNAP®, prueba Lac Tek®, *Charm* Bacillus sterothermophilus®, prueba *Charm* Farm®, prueba Brilliant Black reduction® y *Charm* SL Test®, todas aprobadas por U.S Food Administration Center for Veterinary Medicine.

Las pruebas rápidas inicialmente fueron diseñadas para detectar penicilina en leche y productos derivados; pero se han realizado validaciones para demostrar que las pruebas rápidas también son empleadas en la detección de penicilina en sangre, en superficies expuestas y productos farmacéuticos, confirmando su alta sensibilidad, selectividad para la determinación de antibióticos y confiabilidad en los resultados obtenidos.⁽⁴⁾

Prueba SNAP®, es un ensayo inmunológico de enzima receptor, determina residuos de Penicilina G, Amoxicilina, Ampicilina Ceftiofur y Cefapirina con una sensibilidad de 5 ppb (partes por billón) de penicilina G con una exactitud del 90-95% y 5-10% de presentar resultados falsos. Es una prueba aprobada por la FDA para su uso en productos lácteos, en la industria farmacéutica su uso es de carácter interno, avalada con la aprobación de la FDA.

Ventajas como la no-reactividad cruzada con otros fármacos (a 50 ppb la Cloxacilina, Dicloxacilina, Ticarcilina y Cefadroxil no presentan reactividad cruzada), el corto período de tiempo empleado en la prueba y su alta sensibilidad, hacen de la prueba SNAP aplicable en la detección de trazas de penicilina.

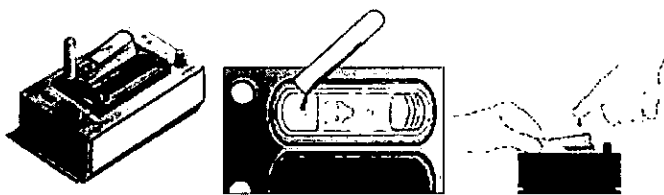
La metodología que sigue la prueba es sencilla, el "Kit" cuenta con un dispositivo SNAP®, tubo para muestra con reactivo de color y una pipeta dosificadora.



Fig. 7 Componentes del Kit SNAP®

Se colocan las muestras previamente homogeneizadas con el reactivo de color en el dispositivo SNAP®, se incuban a $45^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 9 minutos, tiempo en que transcurre la reacción enzimática, posteriormente se observan los resultados visuales o en lector. Las muestras se deben leer inmediatamente o los resultados son invalidados.

Fig. 8 Metodología prueba SNAP®



1. Incubar el dispositivo y tubo SNAP® 2. Adicionar la muestra 3. Activar y leer.

Desventajas de la prueba SNAP® son: presencia de reacción cruzada con ciertos fármacos a concentraciones de 100 ppm (Sulfadiazina, Sulfanilamida, Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clorotetraciclina, Gentamicina, Estreptomicina, Eritromicina, Dipirona entre otros), reacción cruzada con productos que contengan enzimas en su formulación, su costo y su disponibilidad comercial.

Prueba Charm Safe Level Beta - Lactam® (aprobada por la FDA Center for Veterinary Medicines en mayo de 1999, por el Executive Committee of the National Commission of Interstate Milk Cipers y AOAC-RJ) es una prueba diseñada para la detección de Amoxicilina, Ampicilina, Cefotiofur, Cefapirina y Penicilina G en leche cruda de bovino. (28, 32)

Presenta una sensibilidad a productos Betaláctamicos por debajo de los niveles de tolerancia/seguridad estipulados por la FDA

Fármaco	Sensibilidad Charm (ppb)	Nivel seguro FDA (ppb)
Amoxicilina	5.6	10
Ampicilina	8.5	10
Cefotiofur	46	50
Cefapirina	13.7	20
Penicilina G	3.6	5
Cloxacilina	*	10

Tabla D. Sensibilidad a fármacos Betaláctamicos Charm SL test®

La prueba Charm SL Beta Lactam®, es una prueba con receptores que utiliza la tecnología ROSA (Rapid One Step Assay) o ensayo en un solo paso.

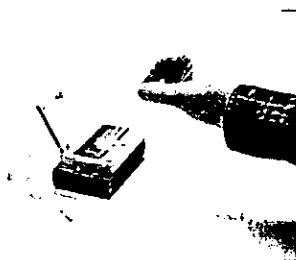


Fig. 9 Dispositivo Charm SL Test®

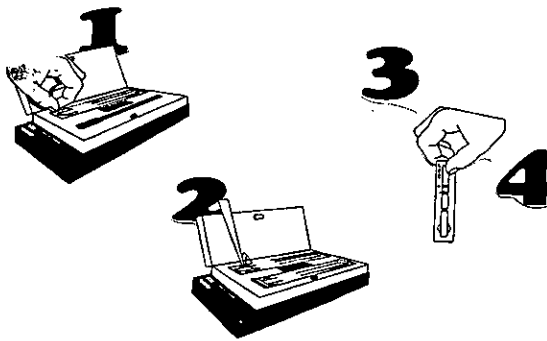
El método es un inmunoensayo de flujo lateral que utiliza oro coloidal como partícula detector y se realiza en un solo paso. La prueba utiliza un receptor

bacteriano cuya sensibilidad ha sido ajustada de su actividad biológica natural. De este modo detecta de una manera más precisa las concentraciones determinadas como seguras o tolerantes.

El diseño del ensayo SL ROSA es apropiado para detectar antibióticos Betaláctamicos con un rango reducido de positivos no violatorios que suelen presentarse en las pruebas hipersensibles.

La metodología que se sigue es sencilla, es de un solo paso porque a diferencia de la prueba SNAP®, en Charm SL Test® sólo se realiza una incubación. En la siguiente figura se puede apreciar.

Fig. 10 Metodología Charm SL Test®



- 1** Despegue la cinta protectora de la tira hasta la marca de color blanco.
- 2** Adicione lentamente por un costado del compartimento de la muestra 300µL. Cierre el incubador ROSA, e incube por un período de 8 min. + 2 min. $56 \pm 1^\circ\text{C}$.
- 3** Retire la tira del incubador después del período de incubación.
- 4** Leer visualmente y reportar. Verifique que la tira es válida.

Los receptores con afinidad para Betaláctamicos son unidos a partículas visibles (oro coloidal). Los receptores son colocados en una tira de soporte sólido y se hacen móviles al ser rehidratados con la muestra. El complejo muestra-receptor fluye de manera lateral a través de la tira mientras cualquier betalactámico presente en la muestra se une a los receptores. La fase móvil atraviesa la línea de prueba (T) donde un conjugado betalactámico y el receptor microbiano sin reaccionar se unen para formar una línea de color rojo (T). Los receptores sin unir continúan su flujo hasta la línea control (C) donde se encuentran fijados anticuerpos antireceptores que al unirse a éstos forman una línea de color rojo.

La interpretación de los resultados puede ser de forma visual o por medio de un lector automatizado (medición de la intensidad de color); de forma visual una línea de prueba (T) igual o más oscura que la línea control (C) indica una prueba negativa ya que existe una cantidad insuficiente de antibiótico betalactámico que compita por los sitios de unión en la línea T.

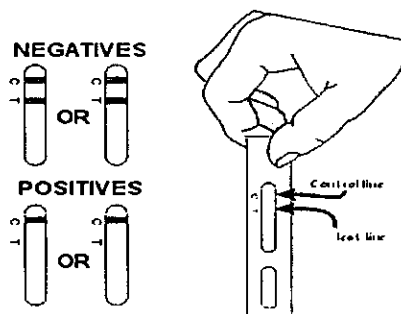


Fig. 11 Interpretación visual Charm SL Test®

Una línea control (C) más oscura o igual que la línea de prueba (T) indica que existe en la muestra una cantidad suficiente de antibiótico para competir por los sitios de unión con receptor en la línea T.

La tira puede ser introducida en el lector ROSA, el cual en 5 segundos compara la oscuridad/densidad de las dos líneas formadas y proporciona una interpretación (positivo/negativo).

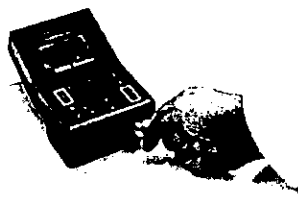


Fig. 12 Lector para tiras Charm SL test®

Sus ventajas son: detecta 5 antibióticos Betaláctamicos de los 6 regulados; alta sensibilidad y especificidad; es una prueba que se realiza en un solo paso; tiempo de duración de 8.5 minutos; el resultado permanece estable hasta 24 horas después de haber realizado la prueba; uso de lector (resultado numérico); cuantificable; el diseño del dispositivo requiere poco espacio para su almacenamiento (optimización de espacios de refrigeración) y su costo es equivalente a un ensayo de cilindro placa por lo que es un método asequible y seguro para la industria.

5. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE TRAZAS DE PENICILINA EN LA PLANTA BETALACTÁMICA.

1. OBJETIVO:

Describir la metodología a seguir al evaluar la ausencia de trazas de penicilina en el exterior de la planta Betalactámica.

2. ALCANCE:

Este procedimiento aplica a toda superficie externa de la planta Betalactámica y al sistema de alta contención.

Este procedimiento involucra las áreas de:

- Control Biológico
- Planta Betalactámica
- Área de mantenimiento

3. POLÍTICA:

Por lineamientos internos, de acuerdo a la NOM-059 -SSA1-1993 y Code Federal Regulations, Title 21, Volume 4, Parts 200 to 229, FDA; es de carácter obligatorio verificar la ausencia de trazas de penicilina en el exterior de la planta Betalactámica.

4. RESPONSABILIDADES:

Es responsabilidad del Jefe de Control Biológico, actualizar, divulgar y mantener vigente este procedimiento, así como vigilar su seguimiento.

Es responsabilidad del Químico Analista seguir este procedimiento.

5. DEFINICIONES:

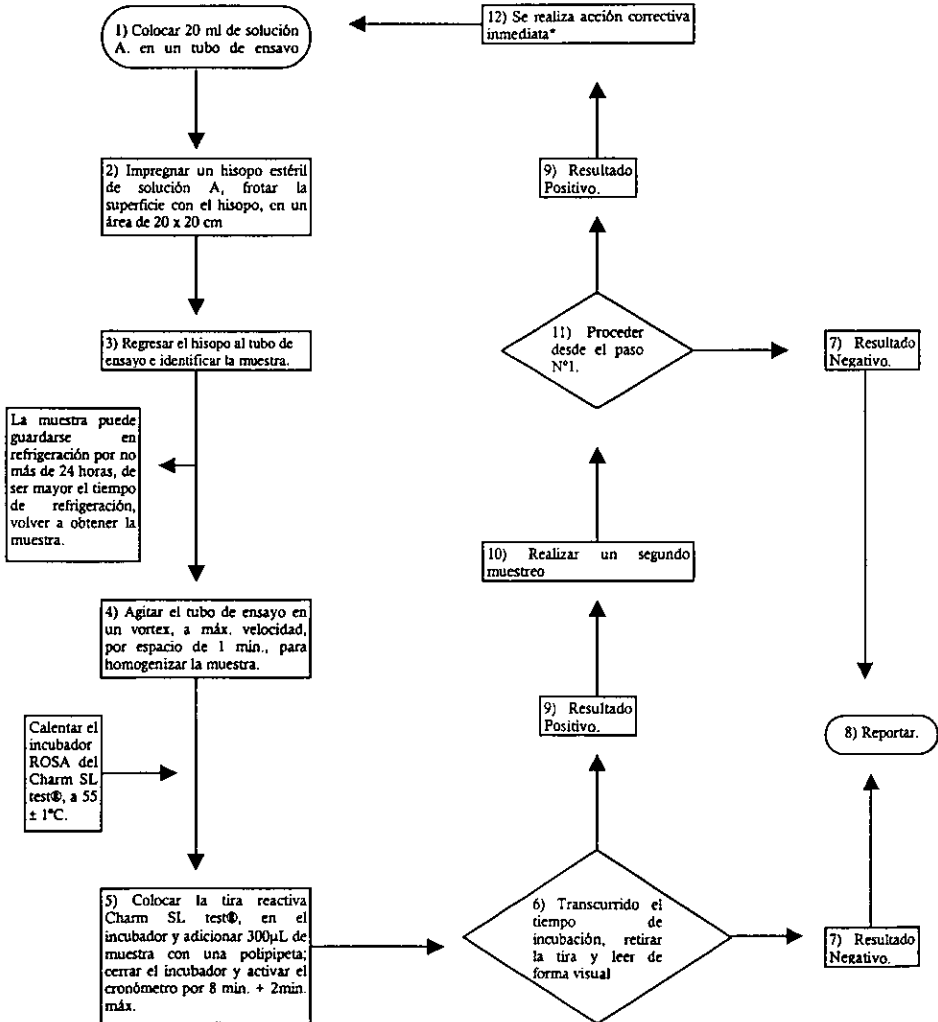
Traza de penicilina: Es la mínima cantidad de penicilina que es detectada sobre una superficie y/o producto.

6. MATERIALES Y/O EQUIPO:

- Hisópos estériles
- Vasos de precipitados 150 mL estéril
- Tubos de ensayo de 22 x 150 mm estériles
- Solución reguladora de fosfato de potasio pH=6.0 estéril (Solución A)
- Pipetas serológicas estériles 10 mL
- Polipipetas 300 µL
- Dispositivo o kit Charm SL Beta-lactama Test®
- Muestreador de aire (*RCS air sample Biotest Hycon®*)
- Tiras de agar soya tripticaseína para muestreador de aire (*Pro-biotec®*)
- Cronómetro
- Agitador eléctrico (vórtex)
- Gradilla
- Guantes de látex
- Cofia, cubre boca, bata de algodón
- Germicida en uso

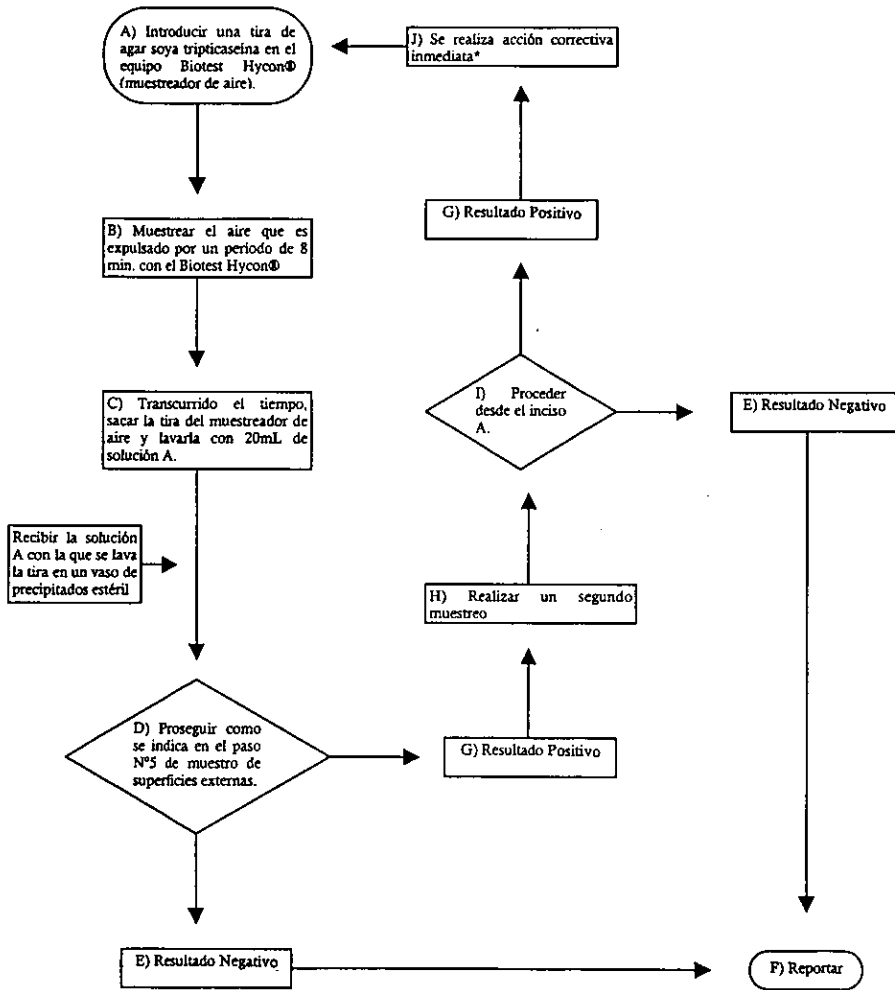
7. FLUJOGRAMA:

7.1 Muestreo de superficies externas:



7.2

Muestreo del sistema de Alta Contención:



8. PROCEDIMIENTO:

8.1 Toma de muestras en superficies externas.

- 8.1.1 Colocar 20 ml de solución reguladora de fosfato de potasio pH=6.0 previamente estéril (121°C, 15lb/in², autoclave *Steris*®) en un tubo de ensayo de 22 x 150 mm estéril (Solución A).
- 8.1.2 Impregnar en la solución A, un hisopo de esponja previamente estéril y frotar la superficie a muestrear en un área de 20 x 20 cm aproximadamente, regresar el hisopo al tubo de ensayo e identificar.
- 8.1.3 Agitar el tubo de ensayo conteniendo el hisopo en un vórtex a máxima velocidad por espacio de 1 minuto para homogenizar la muestra.
- 8.1.4 Colocar la tira reactiva Charm SL Test en el incubador y adicionar 300 µL de muestra en la cavidad de la tira con ayuda de la polipipeta, cerrar el incubador y accionar el cronómetro. Dejar incubar la muestra por un periodo de 8 min. + 2 min. máximo.
- 8.1.5 Transcurrido el período de incubación, retirar la tira del incubador y leer de forma visual el resultado.
- 8.1.6 Si el resultado es negativo, proceder a reportar la ausencia de trazas de penicilina en las áreas evaluadas; si el resultado es positivo, realizar un segundo muestreo para descartar posibles falsos positivos.
- 8.1.7 Si realizado el segundo muestreo se presenta un resultado positivo, implementar acción correctiva inmediata por parte del responsable de la planta Betalactámica. La acción correctiva inmediata consiste en lavar con solución de hidróxido de sodio al 2% y enjuagar con abundante agua por lo menos tres veces toda aquella superficie contaminada. La inactivación de superficies puede también realizarse con solución de penicilinas (10,000U/mL) o con solución germicida de cidex (Glutaraldehído 5%).

8.2 Toma de muestras en el sistema de Alta Contención

- 8.2.1 Colocar una tira de agar soya tripticaseína marca *Pro-biotec*®, en el muestreador de aire *Biotest Hycon air sample*®.
- 8.2.2 Muestrear por un periodo de 8 minutos el aire expulsado a través del sistema de alta contención de la planta Betalactámica con ayuda del equipo *Biotest*.
- 8.2.3 Transcurrido el tiempo de muestreo, retirar la tira del equipo *Biotest* y lavarla con 20 mL de solución A, recibir la solución de lavado en un vaso de precipitados de 150 mL estéril.
- 8.2.4 Proceder como se indica en el punto 8.1.4 de muestreo de superficies externas.
- 8.2.5 Si el resultado es negativo, proceder a reportar la ausencia de trazas de penicilina en las áreas evaluadas; si el resultado es positivo, realizar un segundo muestreo para descartar posibles falsos positivos.
- 8.2.6 Si realizado el segundo muestreo se presenta un resultado positivo, implementar acción correctiva inmediata por parte del responsable de la planta Betalactámica. La acción correctiva inmediata en el sistema de alta contención dependerá de la decisión del responsable de la planta Betalactámica, el cual emitirá un reporte informando la fecha en la cual podrá realizarse otro muestreo.
- 8.2.7 La trampa de aceite perteneciente al sistema de alta contención, se muestrea con el método de superficies externas.

8.3 Posiciones y Frecuencia de muestreo de trazas de penicilina en la planta Betalactámica

En el Anexo 1, se mencionan las posiciones y la frecuencia de muestreo de trazas de penicilina.

El muestreo se realiza en superficies externas y en el sistema de alta contención de la planta Betalactámica, ubicado en la parte superior del edificio C de los Laboratorios ICN Farmacéutica SA de CV® planta Ermita. Localizados en: Avenida Ermita Iztapalapa Número 436. Colonia Mexicaltzingo, Delegación Iztapalapa. Zona Oriente, Ciudad de México.

9. REFERENCIAS:

- 9.1 Revisión de procedimientos para la detección de penicilina., Gordon G.Carter., Centro Nacional de Análisis de Antibióticos, Bureau of Drugs., Noviembre 1977., Págs. 119-137.
- 9.2 Charm Sciences inc. Charm Rosa Technology®, Manual del operador. <http://www.charm.com>

10. ANEXOS:

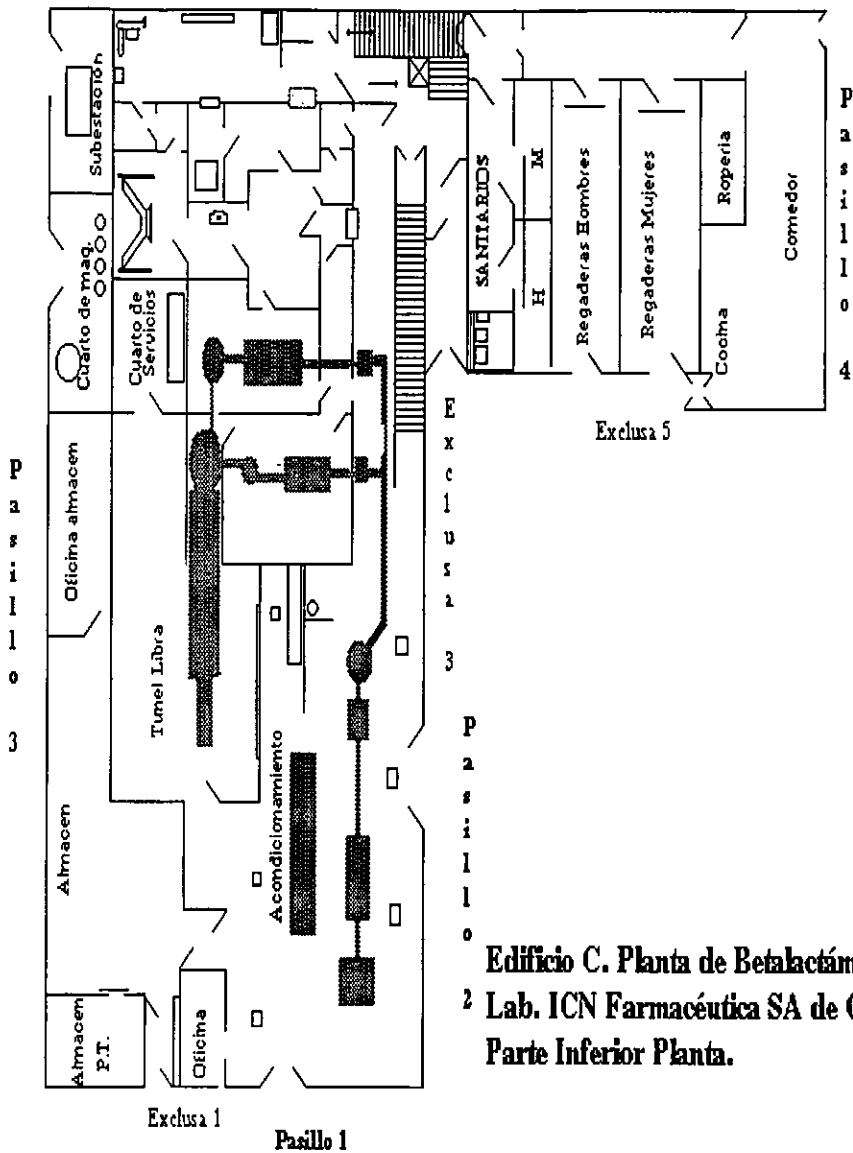
Total de Anexos 3.

TERMINA DOCUMENTO

ANEXO I

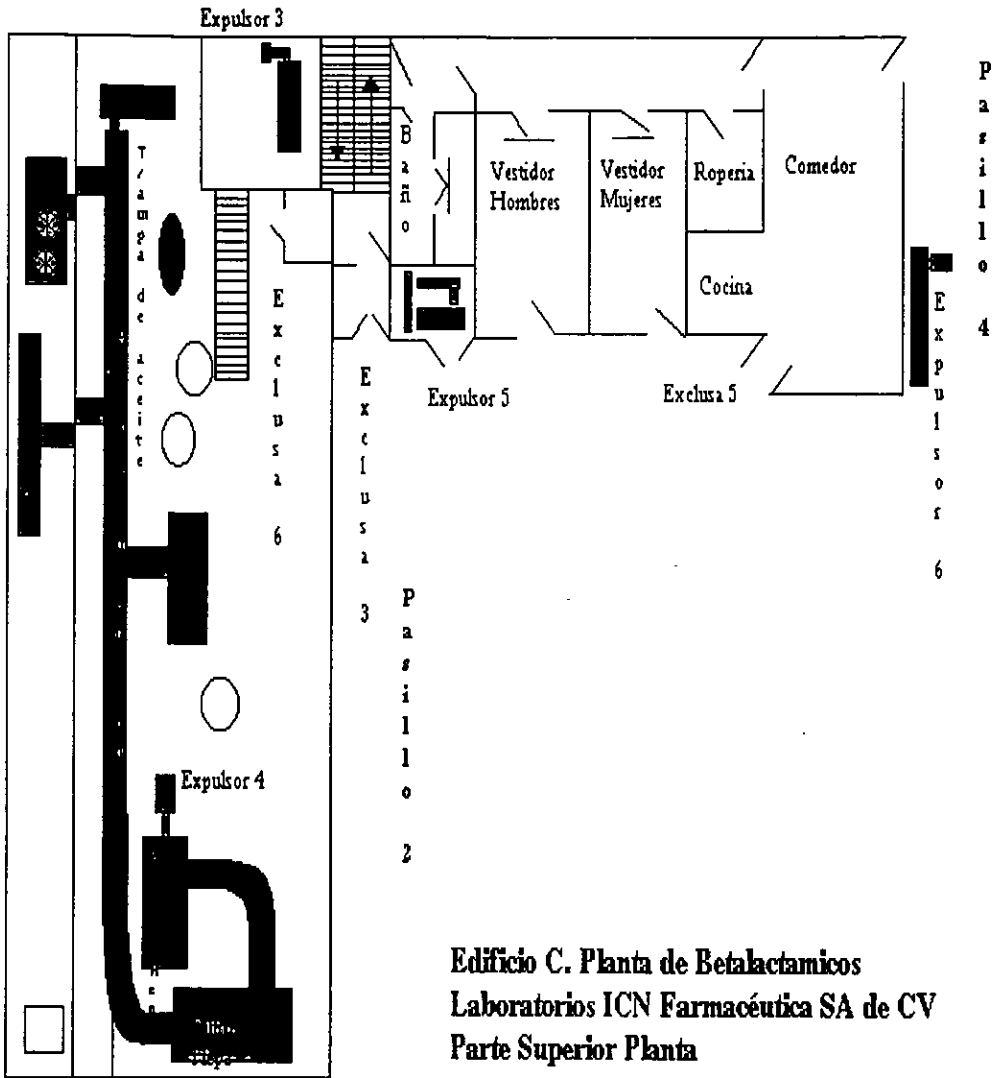
Punto de muestreo	Ubicación	Frecuencia
Pasillo 1	Frente al edificio	1 vez por mes
Pasillo 2	Costado derecho del edificio	1 vez por mes
Pasillo 3	Costado izquierdo del edificio	1 vez por mes
Pasillo 4	Salida emergencia comedor	1 vez por mes
Esclusa 1	Pasillo 1, entrada y salida de materiales	1 vez por mes
Esclusa 3	Pasillo 2, entrada y salida de materiales	1 vez por mes
Esclusa 5	Entrada y salida de materiales comedor	1 vez por mes
Esclusa 6	Parte superior del edificio	1 vez por mes
Trampa de aceite	Sistema de alta contención, parte superior del edificio	1 vez por mes
Expulsor de aire 3	Sistema de alta contención, parte superior del edificio	1 vez por mes
Expulsor de aire 4	Sistema de alta contención, parte superior del edificio	1 vez por mes
Expulsor de aire 5	Sistema de alta contención, costado esclusa 3	1 vez por mes
Expulsor de aire 6	Sistema de alta contención, pasillo 4 zona comedor	1 vez por mes

Tabla E. Puntos y frecuencia de muestreo



Edificio C. Planta de Beta lactámicos
2 Lab. ICN Farmacéutica SA de CV
Parte Inferior Planta.

ANEXO 2



**Edificio C. Planta de Betalactamicos
Laboratorios ICN Farmacéutica SA de CV
Parte Superior Planta**

Fig. 13 y 14 Diagrama de Instalaciones planta Betalactámica.

ANEXO 3

6. RESULTADOS.

A continuación se muestran los resultados obtenidos en el muestreo anual de la planta Betalactámica. Durante los meses de Enero a Octubre del año 2000, el análisis se realizó por método SNAP®, en los meses de Noviembre y Diciembre a la fecha, el análisis se realiza por método Charm SL Test®.

Todos los resultados mostrados, son autorizados por el Laboratorio Farmacéutico ICN Farmacéutica S.A. de C.V.

En los puntos de muestreo, donde el resultado fue positivo, se realizó una acción correctiva inmediata, consistió en desactivar las superficies contaminadas con solución de hidróxido de sodio (sosa) al 2%.

La frecuencia y puntos de muestreo se especifican en el procedimiento normal de operación, ambos fueron asignados por el departamento de control microbiológico, basados en normas internas del laboratorio.

Punto de Muestreo	Ene 2000	Feb 2000	Mar 2000	Abr 2000	May 2000	Jun 2000	Jul 2000	Ago 2000	Sep 2000	Oct 2000	Nov 2000	Dic 2000
Pasillo 1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Pasillo 2	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
Pasillo 3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Pasillo 4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Esclusa 1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Esclusa 3	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
Esclusa 5	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Esclusa 6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Trampa de aceite	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Expulsor de aire 3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Expulsor de aire 4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Expulsor de aire 5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Expulsor de aire 6	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla F. Resultados de muestreo trazas de pesticidas año 2000.

7 ANALISIS DE RESULTADOS

En el siguiente histograma se observan los puntos de muestreo que resultaron con presencia de trazas de penicilina, lo cual indica contaminación de tipo químico en el exterior de la planta Betalactámica.

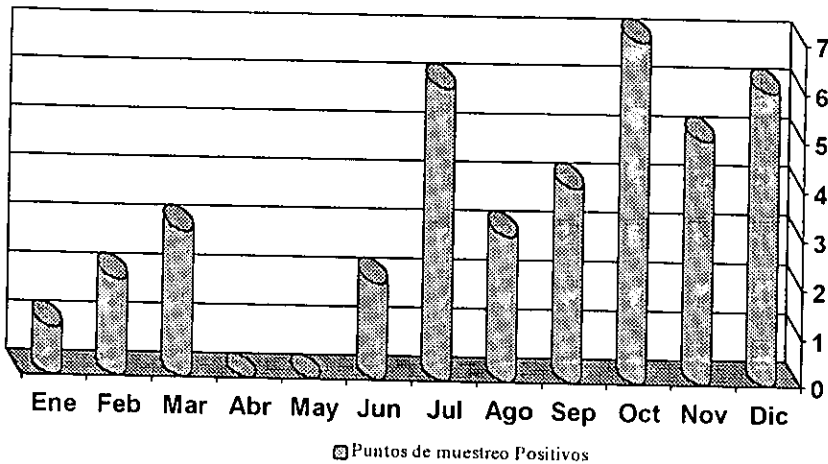


Fig. 15 Histograma: resultados de trazas de penicilina

Durante los meses de octubre a diciembre, la presencia de trazas de penicilina en las superficies exteriores de la planta Betalactámica se incrementó, lo que puede originar un severo problema de contaminación cruzada y ambiental.

En los meses anteriores, se puede suponer la presencia de trazas de penicilina, pero no fue detectada la contaminación debido a la sensibilidad del método analítico utilizado para su determinación (falsos negativos).

Las posibles causas que están originando la contaminación en la planta Betalactámica, se muestran en el siguiente diagrama de causa y efecto.

DIAGRAMA DE CAUSA Y EFECTO "TRAZAS DE PENICILINA"

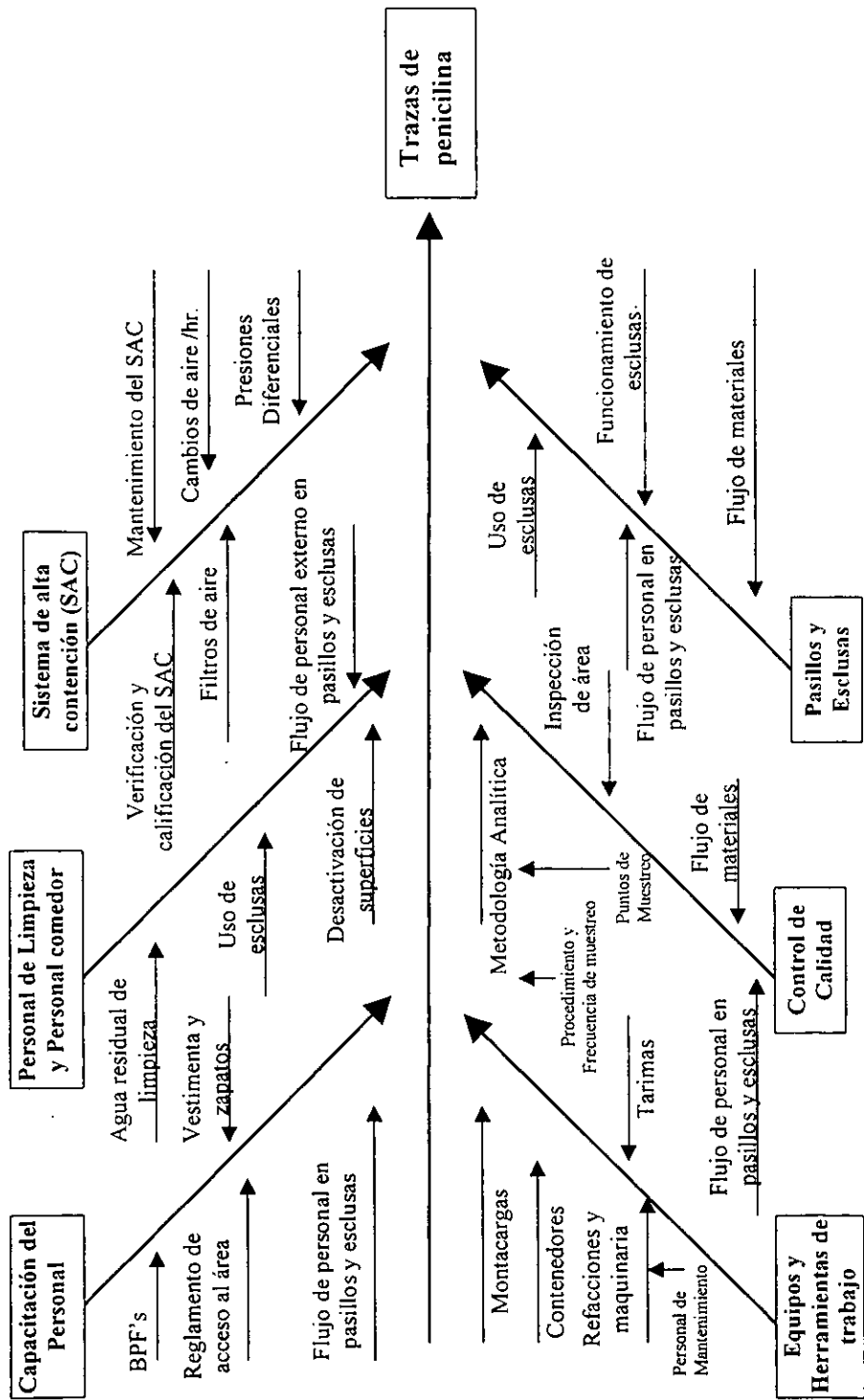


Fig. 16 Diagrama de causa y efecto trazas de penicilina

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La evaluación del sistema de control de la contaminación ambiental de la planta Betalactámica, nos permite verificar el seguimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación.

Los resultados nos muestran que la planta Betalactámica presenta contaminación de penicilina en su exterior, por lo que es indispensable determinar la causa raíz del problema para erradicarlo.

Evaluando integralmente la información obtenida, se proponen las siguientes recomendaciones:

1. Impartir cursos de capacitación al personal que labora en la planta Betalactámica acerca de Buenas Prácticas de Fabricación y temas relacionados con calidad y administración ambiental. El personal capacitado podrá colaborar efectivamente en la prevención de la contaminación.
2. Establecer un programa de seguimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación, en particular del personal que esporádicamente acceda a la planta Betalactámica.
3. Establecer un programa de desactivación de superficies externas contaminadas, que considere el empleo de agentes desactivantes no tóxicos y se de seguimiento al mismo.

-
4. Desactive el agua residual de limpieza de la planta Betalactámica, no desechar directamente al drenaje, tampoco lavar las superficies externas de la planta con esta agua. Construir una trampa para el agua residual en donde se lleve a cabo la desactivación y posteriormente deseche al drenaje.
 5. Restringir el paso del personal ajeno a la planta Betalactámica (pasillos exteriores) a fin de evitar el arrastre de contaminación hacia otras superficies y áreas no betalactámicas.
 6. Construir un laboratorio de control de calidad en donde se realicen todas las pruebas fisicoquímicas de los productos Betaláctamicos; evitar el llevar muestras de análisis a otros departamentos que no pertenecen al área Betalactámica.
 7. Verificar periódicamente el funcionamiento de esclusas; limitar su uso, el flujo de personal y de materiales. Documentar fechas de mantenimiento y verificación de las mismas.
 8. Es necesario construir esclusas que permitan el flujo de materiales y de personal por el interior de la planta, ningún material que se encuentre en el interior de la planta, debe salir de la misma, en caso de que así sea, deberá ser desactivado antes de salir.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

-
9. Evaluar y calificar periódicamente el sistema de alta contención de la planta Betalactámica. Verificar que los filtros de inyección y extracción de aire, sean los adecuados y estén cumpliendo con su función. Es necesario llevar un registro de fechas de calificación y mantenimiento del sistema. Todo cambio o desviación en el sistema de alta contención deberá ser documentado y evaluado posteriormente.
 10. Modificar los puntos de muestreo, considerando como puntos críticos aquellos donde el flujo de materiales y de personal es concurrido. La frecuencia de muestreo debe ser aquella que permita demostrar la eficiencia del sistema de control de la contaminación; los resultados obtenidos deben ser representativos de la ausencia de trazas de penicilina.
 11. Proveer a la planta con equipo de trabajo suficiente, para evitar el tener que llevarlos al exterior de la misma (montacargas, contenedores, tarimas, etc).
 12. Aplicar una metodología analítica que permita determinar y obtener con un alto grado de sensibilidad y confiabilidad resultados, basándose en este punto, se recomienda aplicar metodologías asequibles y oportunas a la industria, por lo que el método de Charm SL Test® es el método de elección, y como prueba alternativa para la determinación de trazas de penicilina, el método de espectroscopia Infrarroja, permite determinar de forma rápida, confiable y precisa la presencia de trazas de penicilina. Conocer el fundamento de varias metodologías analíticas, permiten al analista elegir la que más se adecue a sus necesidades.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla A.	Interpretación RMN	10
Tabla B.	Propiedades Físicas y Químicas de sales de penicilina	12
Tabla C.	Comparación de Métodos Analíticos para determinar trazas de penicilina	13
Tabla D.	Sensibilidad a fármacos Betalactámicos Charm SL Test®	29
Tabla E.	Puntos y Frecuencia de muestreo	41
Tabla F.	Resultados muestreo de trazas de penicilina año 2000	45
Figura 1.	Estructura general Betalactámicos	5
Figura 2.	Infrarrojos de productos Betalactámicos	7
Figura 3.	Espectro UV penicilina G Benzatina	8
Figura 4.	Espectro de masas penicilina G Benzatina	9
Figura 5.	Espectro de RMN protónica penicilina G Benzatina	9
Figura 6.	Reacción de hidrólisis valoración yodométrica	14
Figura 7.	Componentes del "Kit" SNAP®	28
Figura 8.	Metodología prueba SNAP®	28
Figura 9.	Dispositivo Charm SL Test®	29
Figura 10.	Metodología prueba Charm SL Test®	30
Figura 11.	Interpretación visual Charm SL Test®	31
Figura 12.	Lector para tiras Charm SL Test®	32
Figura 13 y 14.	Diagrama de instalaciones planta Betalactámica	42
Figura 15.	Histograma resultados trazas de penicilina	46
Figura 16.	Diagrama de causa y efecto trazas de penicilina	47

BIBLIOGRAFÍA

1. Análisis de Penicilina G Procaína y sus mezclas con otros activos y/o excipientes por cromatografía de líquidos., Gist-Brocades Industrial Pharmaceuticals Mexicana, SA de CV., Cuatitlán, México 1998.
2. Bergoglio Remo M.: Antibióticos; Ed. Medica Panamericana 5ª ed.,1993; 48-51, 111-113.
3. Berkow Robert., Fletcher Andrew J.: El Manual Merck de Diagnóstico y Terapéutica; Ed. Océano/Centrum 9ªed., 1994; 28-44, 379-382.
4. Boison Joe O., Korsrud Gary O., Papich Mark G., and MacNeil James D.: Comparison of four commercially available rapid test kits with liquid chromatography for detecting penicillin G residues in bovine plasma., Journal of AOAC International, 1995; 78, 5: 1144 – 1152.
5. Brock Thomas D., Madigan Michael T.: Microbiología; Ed. Prentice Hall Hispanoamericana 6ªed., 1993; 385-395.
6. Budavon Susan.:The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals., Merck and Co., Inc., Twelfth edition., USA 1996.
7. Clarke E.G.C.: Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-Montem Material. The Pharmaceutical Press., London 1969., 218-219.
8. Code of Federal regulations., Title 21, Volume 4, Parts 200 to 229, FDA. Current Good Manufacturing Practice for Finished Pharmaceuticals.
9. Connors Kenneth A.: A Textbook of Pharmaceutical Analysis., Ed. John Wiley and Sons, Third edition, USA 1982, 532-541.
10. Cromatografía y Técnicas Espectroscópicas., Enciclopedia Microsoft® Encarta®99. ©1993-1998 Microsoft Corporation.
11. European Pharmacopoeia., 3ª ed., Council of Europe Strasburg. Published in accordance with the convention on the elaboration of a European Pharmacopoeia., 2001.
12. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos., SSA., Séptima Edición: 2000.
13. Florey Klaus.: Analytical Profiles of Drugs substances., Academic Press Inc., London 1982., 11., 463-481.
14. Flynn Edwin H.: Cephalosporins and Penicillins Chemistry and Biology., Ed. Academic Press Inc., USA 1972., 497-507.
15. Harris G.: Dictionary of organic compounds; Ed. Board; 380-381.
16. <http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/penicill.htm#Penicillin: the story of an antibiotic>
17. <http://members.tripod.com/fotografia/textos/penicilina.htm>

18. <http://www.bbc.co.uk/education/medicine/nonint/modern/dt/modtfc.shtml>
19. http://www.bbc.co.uk/worldservice/sci_tech/features/health/medicinedrugs/medicalhistories/peni.shtml
20. <http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/BOT135/Lect21b.htm>
21. <http://www.monografias.com/trabajos5/antibio/antibio.shtml>
22. Kavanagh Frederick.: *Analytical Microbiology.*, Ed Academic Press., USA 1963., 313-346.
23. Keller J. Roger.: *The sigma-library of FT-IR spectra*; Sigma Chemical company 1sted USA 1986.
24. Martin W. Eric, Kazin E. Louis, McDonnell N Jonn., Gennaro R.A., et. Al.: *Remington: The Science and Practice of Pharmacy.*, 20th ed., Ed. Planning Board. Easton Pennsylvania. 1516-1519.
25. Norma Oficial Mexicana NOM – 053 - SSA1 – 1993., *Buenas Prácticas de Fabricación para establecimientos de la industria Química Farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.* Publicada en el diario Oficial el 31 de Julio de 1998.
26. Pelczar Michael J., Reid Roger d., Chan E.C.S.: *Microbiologia*; Ed. McGraw-Hill 4thed., 1996; 408-432.
27. Reichert Benno Dr.: *Tratado de Farmacia Práctica*; Ed. Labor, 1948; V, 947-950.
28. Saul Steven., Boyer Cheryl., Markovsky Robert., Salter Robert., Lawton-Scheemaker Joan., and Charm Stanley.: *The new Charm SL (safe level) Beta lactam Test-Significantly Reduces Rejection of milk positive by other screening test.* Charm Sciences, Inc., Malden, MA 02148. <http://www.charm.com>.
29. Schirmer Roger E.: *Modern Methods of Pharmaceutical Analysis.*; Ed CRC/Pres 2nded., USA 1991., I, 264-267.
30. Silverstein R.M., Clayton G.: *Spectrometric identification of organic compounds*; John Wiley and sons Inc. 5thed., USA 1991. 91-102.
31. Svehla G.: *Analytical Voltammetry*; Ed. Elsevier, 1992; XXVII, 187-190.
32. Thorogood Shirley A., Wood Peter D.P., and Prentice George A.: *An evaluation of the charm test- a rapid method for the detection of penicillin in milk.*, Journal of Dairy Research, 1983; 50. 185-191.
33. *United States Pharmacopeia and National Formulary*; The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 24 ed., 2000.