



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA PRUEBA  
DE ESTERILIDAD DE UNGÜENTOS OFTÁLMICOS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**AMÉRICA SERRANO LAGUNAS**



**MÉXICO, D.F.**

**Mayo 2012.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: RAÚL GARZA VELASCO**

**VOCAL: MARÍA DEL SOCORRO ALPÍZAR RAMOS**

**SECRETARIO: DANIEL GARCÍA ESCANDÓN**

**1er. SUPLENTE: BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN**

**2° SUPLENTE: ABRAHAM FAUSTINO VEGA**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**Alcon Laboratorios S.A. de C.V. Departamento de Control Microbiológico**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Q.B.P. Daniel García Escandón**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

**Q.B.P. Carlos Humberto Brito Gómez**

**SUSTENTANTE:**

---

**América Serrano Lagunas**

*Muere lentamente quien no viaja, dice Neruda,  
y después de este largo viaje me siento más viva que nunca...*

*A mi familia,  
que sencillamente lo ha dado todo por mí...*

## Agradecimientos

Agradezco a dios por ayudarme a terminar este proyecto, gracias por darme la fuerza y el coraje para hacer este sueño realidad, por la vida y la iluminación de cada día, hubiera sido imposible sin tu ayuda y la de mis dos angelitos Leticia e Ivan.

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras, están en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas dedicatorias quiero darles las gracias por formar parte de mi ,por todo lo que me han brindado y por todas sus bendiciones y sobre todo agradecer a dios por ponerlos en mi camino.

Mami mi ejemplo a seguir, gracias por tu apoyo, esfuerzo y amor por impulsarme día a día y enseñarme que por un ideal se vive, se lucha y se triunfa. Te AMO

Papá este es un logro que quiero compartir contigo, gracias por ser mi papá y confiar en mí, quererme y esperar mi llegada para poder dormir. Te AMO

Luis mi gran hermano gracias por todo ese apoyo y confianza que depositaste en mi por guiar y velar cada uno de mis pasos.

Laura mi súper hermana, gracias por todo lo que has hecho por mí, por tus sacrificios y bellas acciones, pero sobre todo gracias por ser mi segunda mamá.

Joaquín mi hermanito gracias por compartir conmigo cada logro apoyarme y estar ahí para mí.

Alfredo, Diego, David, Ulises y Emiliano mi gran inspiración por que una sonrisa suya bastaba para seguir adelante.

Leslie y Alfredo gracias por formar parte de este sueño, por contribuir con este logro.

Emmanuel gracias por estar en mi vida, apoyarme, comprenderme, por hacerme sentir siempre segura de mi misma y sobre todo por soportar los berrinches. No me alcanza un simple agradecimiento para expresarte lo que siento, pero sé que sabes cuánto significas para mí.

Familia López Plata y Familia Ramírez García gracias por haber permitido que formara parte de ustedes, por su cariño y apoyo incondicional.

Elizabeth y Josefina muchísimas gracias por su apoyo y su valiosa amistad por quererme y guiarme, y sobre todo gracias por sus valiosas aportaciones.

José Luis gracias profesor por compartir conmigo sus conocimientos y sobre todo su amistad.

Yazmin, Gabriela, Diana, Katina, Karen, Karina, María, Estephany, Alfredo y Marco gracias por que han sido los mejores amigos he vivido momentos inolvidables con ustedes los quiero y siempre los llevare en mi corazón.

A la familia Lagunas Gama gracias por su apoyo, cariño y buenos momentos.

A mis abuelitos Isabel, Rosa y Eufrocino los quiero.

A los laboratorios Alcon por brindarme la oportunidad y confiar en mí, fue una experiencia el haber trabajado ahí, aprendí muchas cosas que me servirán en mi vida laboral, pero sobre todo encontré buenos amigos. Daniel gracias por que más que un asesor eres un amigo, gracias por tu apoyo y consejos. Noé gracias por tu inmenso apoyo consejos y enseñanzas pero sobre todo por tu amistad. Carlos Brito gracias por compartir conmigo su conocimiento, experiencia y amistad, pero sobre todo gracias por la paciencia y confianza depositada en mí. Julio gracias por tantos buenos momentos y enseñanzas.

A la UNAM en especial a la Facultad de Química, mi segunda casa porque es un orgullo pertenecer a ella, por que se que en ella he adquirido la mejor formación y con orgullo podre decir:

*“Por mi raza hablara el espíritu”*

# Índice

## Capítulo 1. Introducción 1

1.1 Justificación del problema .....	1
1.2 Objetivos .....	2
1.3 Hipótesis.....	2

## Capítulo 2. Marco teórico 3

2.1 Historia de la validación .....	3
2.2 Validación en México .....	5
2.2.1 Regulación oficial.....	6
2.2.2 Aseguramiento de la calidad .....	8
2.2.3 Reducción de costos.....	8
2.3 Validación en la industria farmacéutica.....	10
2.4 Control microbiológico .....	12
2.5 Validación de métodos microbiológicos.....	14
2.6 Preparados oftálmicos .....	14
2.7 Ungüentos oftálmicos .....	16
2.8 Peligros de productos oftálmicos no estériles .....	17
2.9 Uso de los conservadores para uso oftálmico .....	18
2.2.1 Alcoholes y fenoles sustituidos .....	21
2.2.2 Esteres del ácido parahidroxibenzoico.....	21
2.10 Prueba de esterilidad .....	22
2.11 Validación de la prueba de esterilidad .....	22
2.12 Métodos de validación de la prueba de esterilidad .....	24
2.2.1 Inoculación directa del medio de cultivo .....	24
2.2.2 Filtración por membrana.....	24
2.2.3 Sistema Steritest.....	25
2.13 Neutralización de conservadores .....	28

## Capítulo 3. Diseño experimental 30

3.1 Material, soluciones, medios de cultivo y equipo .....	30
3.1.1 Materiales.....	30
3.1.2 Soluciones.....	31
3.1.3 Medios de cultivo .....	31
3.1.4 Equipos .....	31
3.1 Material biológico.....	32

<b>Capítulo 4. Metodología</b>	<b>33</b>
4.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo.....	33
4.1.1 Soluciones.....	33
4.1.2 Prueba de esterilidad a soluciones.....	33
4.1.3 Medios de cultivo y su control de calidad.....	34
4.1.4 Determinación de pH .....	34
4.2 Preparación de suspensiones de microorganismos .....	35
4.3 Selección de las muestras.....	38
4.4 Preparación de MIP .....	40
4.5 Preparación de las muestras .....	40
4.6 Preparación del inóculo .....	40
4.7 Control positivo .....	40
4.8 Procedimiento de prueba.....	41
4.9 Confirmación del inóculo de prueba .....	43
4.10 Condiciones de incubación.....	44
4.11 Verificación de crecimiento.....	45
4.12 Tinción de Gram .....	45
4.13 Criterios de aceptación.....	47
<b>Capítulo 5. Resultados.....</b>	<b>48</b>
<b>Capítulo 6. Análisis de resultados.....</b>	<b>69</b>
<b>Capítulo 7. Conclusiones.....</b>	<b>71</b>
<b>Capítulo 8. Bibliografía.....</b>	<b>72</b>

## **Capítulo 1. Introducción**

### **1.1 Justificación del problema**

En la industria farmacéutica es de vital importancia proporcionar medicamentos de calidad, efectivos y seguros, no sólo para satisfacer las necesidades del consumidor, si no para cumplir con los criterios establecidos por los ministerios de salud que rigen en cada país. Las compañías farmacéuticas, tienen departamentos de aseguramiento de calidad que se encargan de supervisar todo el proceso, ya que realizar pruebas al producto terminado no garantiza que durante su proceso no haya sucedido alguna desviación que pudiera haber afectado la calidad o propiedades del producto.

Dependiendo de la naturaleza del fármaco, se deben cumplir con ciertas especificaciones que se indican en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para nuestro país. Para los productos oftálmicos y parenterales, se establece que deben ser estériles, lo cual se demuestra de acuerdo a la Farmacopea por medio de la prueba de esterilidad, que deben realizarse antes de que el lote sea liberado para su venta al público y que se realiza al producto terminado.

En la farmacopea se establecen dos métodos para realizar esta prueba: por inoculación directa y por filtración en membrana; se señala que se debe utilizar de preferencia el método de filtración en membrana siempre que la naturaleza del producto así lo permita. También indica que se debe validar antes o de forma simultánea a la realización de la prueba de esterilidad; en el caso de los ungüentos oftálmicos analizados esta prueba se realiza por filtración en membrana. Durante una prueba de esterilidad por filtración en membrana el propósito general es que si algún microorganismo se encuentra presente en el producto, éste sea retenido en la membrana y, realizando enjuagues de dicha membrana se pueda eliminar o inactivar algún resto de conservadores que pudieran persistir sobre la membrana e interferir con la detección de microorganismos.

## **1.2 Objetivo general**

Validar el método de análisis utilizado para realizar la Prueba de Esterilidad en ungüentos oftálmicos por el método de filtración a través de membrana, mediante la evidencia documental que sustente que el método analítico esta validado.

## **1.3 Hipótesis**

La eventual demostración experimental de que la metodología aplicada para la prueba de esterilidad en ungüentos oftálmicos es la adecuada, permitirá detectar cualquier microorganismo viable presente en los ungüentos, siempre que también se logre obtener evidencia documentada que demuestre que el método se encuentra validado.

## Capítulo 2. Marco teórico

### 2.1 Historia de la validación

Las buenas prácticas de fabricación tuvieron su auge alrededor del año de 1938, debido al desastre producido por la sulfonamida, el cual produjo alrededor de 107 muertes; debido a este suceso se dictó el acta de alimentos, medicamentos y cosméticos; posteriormente hacia el año 1962, se produjo un desastre aun mayor debido a la talidomida, la cual provocó graves defectos congénitos en más de 10,000 recién nacidos, dictándose la enmienda del acta de alimentos, medicamentos y cosméticos, documento donde se postulaba que los productos deben ser seguros y efectivos.<sup>(1)</sup>

El concepto de validación, en concordancia con la fabricación de medicamentos, surgió hace más de 20 años.<sup>(2-3)</sup> Fue cuando la FDA (*Food and Drug Administration*) en el año de 1963 revisó las normas relativas al control de la fabricación de los productos farmacéuticos. Estas normas son conocidas como las GMP (*Good Manufacturing Practices*) o cGMP (*current Good Manufacturing Practices*).

En 1978, la palabra validación apareció por vez primera en algunas secciones de las GMP. Sin embargo, en el capítulo de definiciones, el término no aparecía. Más tarde en un documento interno de la FDA se definía validación de forma sencilla: *un proceso de fabricación validado es uno que ha sido comprobado que hace lo que se proponía o intentaba hacerse*. En los 20 años posteriores y hasta hoy se han añadido ideas que pudieron parecer subliminales o incluso novedosas, de las cuales se deben destacar tres aspectos principales:

- Necesidad de documentar el proceso de validación, es decir, disponer de todo por escrito.
- Necesidad de que provea un alto grado de seguridad del proceso, es decir, tener la certeza de que el sistema trabajará correctamente.
- Garantizar que el proceso producirá repetidamente productos aptos, es decir, que cumplan las especificaciones.<sup>(4)</sup>

Las nuevas exigencias de la industria farmacéutica exigen una respuesta eficiente de los productores, la cual permita evidenciar la consistencia de los productos fabricados por ella. Dentro de las GMP's la validación constituye uno de los principales requisitos de calidad a cumplir para garantizar la satisfacción del consumidor.

Un sistema validado es un sistema estable, capaz y robusto. <sup>(5)</sup> Con la validación se logra el aseguramiento de la calidad, reducción de costos, aumento de productividad, cumplimiento de regulaciones, normas y optimización del proceso. <sup>(6)</sup>

La OMS (*Organización Mundial de la Salud*) define la validación como: el acto documentado de probar que cualquier procedimiento, proceso, equipo, material, actividad o sistema, conduce realmente a los resultados esperados. <sup>(7)</sup>

Validar representa la voluntad de invertir en el conocimiento del proceso, en la comprensión de las relaciones entre los diferentes parámetros y en la comprensión de las relaciones entre el proceso y su entorno para, al final, establecer las óptimas y repetirlo. <sup>(8)</sup>

En caso de modificaciones o de que se pretenda mejorar deberá procederse a un proceso de revalidación u otra validación nueva. <sup>(4)</sup>

Sin embargo, la validación es un vocablo con el que también se confundían hace algún tiempo. Definitivamente, la validación se refiere a procesos, sistemas y métodos y supone establecer una evidencia documentada de que un proceso se realiza dando lugar a un producto que está dentro de las especificaciones predeterminadas. <sup>(9)</sup>

Quizás no existe otra definición más clara y a la vez sencilla que la que hizo Chapman <sup>(11)</sup> hace algunos años: *“la validación es el sentido común organizado y documentado”*. En esta frase se vuelven a resumir los pilares básicos de la validación: la organización y la necesidad de documentar resultados; es decir disponer de documentación que demuestre lo que se afirma. Si no existe una estructura clara que marque qué hacer, cómo y para qué se hace cada paso, la validación puede resultar no válida, o incluso,

complicada. Mucho más sencillo resulta el tema de la documentación o registro; la frase *“lo que no se escribió no se hizo y lo que no está escrito no se ha hecho”* es un clásico en la terminología de la validación y todo el mundo la corrobora, ya que cuando se lleva a cabo un ensayo, lo que menos cuesta es registrarlo. Finalmente, el programa de validación queda formalizado con la documentación que demuestra que las pruebas realizadas garantizan la uniformidad entre lotes y que éstos cumplen los criterios de calidad.

## **2.2 Validación en México**

En México, alrededor de los años ochenta, debido a la influencia de Estados Unidos y al gran interés de la Secretaría de Salud por mantener la calidad y seguridad de los medicamentos para los consumidores, se comenzaron a aplicar las buenas prácticas de fabricación, por lo cual se emitió la guía de prácticas adecuadas de manufactura CIPAM y diversas normas; entre ellas, NOM-CC-1-1990 “Sistemas de Calidad Vocabulario”, NOM-CC-2-1990 “Sistemas de calidad, Gestión de calidad. Guía para la Selección y Uso de las Normas de Aseguramiento de calidad” y la NOM -073-SSA1-1993 “Relativa a estabilidad de medicamentos” en dónde se menciona por primera vez el concepto de validación referente a métodos analíticos y sus características.

El gran paso en la historia de la validación y de las BPM en nuestro país se dio al presentarse el 31 de julio de 1998, la NOM-059-SSA1-1993: “Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”.<sup>(8)</sup> Esta establece los requisitos mínimos necesarios para el proceso de los medicamentos y/o productos biológicos comercializados en el país, con el objeto de proporcionar medicamentos de calidad al consumidor; actualmente se encuentra en vigor NOM-059-SSA1-2006, la cual define el concepto de validación como “Evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas”.

El Colegio de los Químicos Farmacéuticos Biólogos, preocupados por la necesidad de manejar criterios uniformes, tanto para llevar a cabo este tipo de estudios, como para presentarlos a las Autoridades Sanitarias, reunió a un grupo de responsables de los departamentos de Desarrollo Farmacéutico y de Control de Calidad de la industria y a profesores universitarios, con el objeto de conocer los diferentes puntos de vista que se utilizaban para la validación de las técnicas analíticas en los laboratorios farmacéuticos y, al mismo tiempo, lo que se estaba enseñando en las Universidades.

Al comprobar que existía, por un lado, una gran diversidad de criterios que se estaban utilizando y la poca importancia que se le estaba prestando a esta actividad y, por otro lado la falta de una guía oficial por parte de las autoridades, el Colegio de los Químicos Farmacéuticos Biólogos se fijó el objetivo de uniformar los procedimientos para llevar a cabo la validación de la metodología analítica y proporcionar información útil y confiable; para tales fines publicó el folleto llamado “Validación de Métodos Analíticos” entre 1990 y 1992.

En la industria farmacéutica existen tres razones importantes para que los procesos se lleven a cabo en forma consistente:

1. Regulación oficial.
2. Aseguramiento de la calidad.
3. Reducción de costos.

### **2.2.1 Regulación oficial**

La Ley General de Salud indica que la Secretaría de Salud es competente para regular medicamentos y demás insumos para la salud, e inclusive, supervisa establecimientos encargados de su elaboración, y se lleva a cabo siguiendo los lineamientos estipulados en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

(12)

La farmacopea es el documento legal instituido por la ley general de Salud donde se establecen los métodos generales de análisis y los requisitos sobre la identidad, pureza y calidad que garantice que los fármacos (principios activos), aditivos, medicamentos y productos biológicos (vacunas y hemoderivados) sean seguros, de acuerdo a las características propias del país, que es expedida y reconocida por la autoridad sanitaria correspondiente.<sup>(13)</sup> Su propósito es coadyuvar a mejorar la salud pública precisando las especificaciones, tolerancias y procedimientos que aseguren la calidad de los medicamentos, mediante el establecimiento de normas reconocidas que puedan ser utilizadas por profesionales de la salud en diversos lugares: fábricas o laboratorios de medicamentos o productos biológicos para uso humano y sus materias primas, con el fin de reducir los riesgos sanitarios en la población que los utilice.<sup>(13)</sup>

La Secretaria de Salud ha emitido diversas normas, ya que es necesario que todos los establecimientos que se encuentran dentro del territorio nacional cumplan con las especificaciones y materiales de referencia, que regulen sus materias primas y control de calidad de sus productos; normas como la NOM-059-SSA1-2006, "Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos", mencionan en general que los métodos de análisis deben estar validados para producto a granel, producto terminado y materia prima. Al hablar de validación dicha norma indica que debe establecerse un protocolo escrito que especifique cómo se llevará a cabo la validación. El protocolo debe especificar los pasos críticos, su programa de seguimiento de actividades y los criterios de aceptación. Antes de su ejecución, el protocolo debe ser revisado por el responsable del proceso o sistema y aprobado finalmente por el responsable de la Unidad de Calidad.<sup>(11)</sup>

En cuanto a la validación de métodos analíticos, en el caso de métodos farmacopeicos para producto procesado o producto terminado deberán realizarse pruebas que demuestren la aplicabilidad del método a su producto e instalaciones y cualquier modificación en un método analítico validado debe ser sometido al proceso de control de cambios.<sup>(11)</sup>

### **2.2.2 Aseguramiento de la calidad.**

Para toda empresa es de suma importancia contar con sistemas que demuestren que el producto o servicio final es de calidad. Esto toma una relevancia aún mayor en la industria farmacéutica, en donde un medicamento que no cumpla con los estándares de calidad adecuados puede tener consecuencias que afecten al paciente. Debido a esto, en los últimos años ha tomado fuerza el concepto de “Aseguramiento de la Calidad”, que no es otra cosa que demostrar que lo que declara calidad, efectivamente la posee. Una de las prácticas que se menciona en las Guías de las Normas GMP (*Good Manufacturing Practices*) para desarrollar estos procesos de calidad en la industria farmacéutica es a través de la validación, herramienta que asegura la certeza de tener un proceso más eficiente y con menor ocurrencia de reprocesos y pérdidas. La validación es, por lo tanto, una metodología claramente diseñada para establecer en forma documentada que un sistema, un proceso de producción o una metodología analítica de control de un producto, cumplen con los parámetros de calidad especificadas. <sup>(14)</sup>

### **2.2.3 Reducción de costos**

La industria farmacéutica, usa materiales costosos, equipo sofisticado y personal calificado; además el costo por fallas en los productos representa una parte significativa del costo total de producción.

Los costos de calidad en plantas y compañías se contabilizan de forma que incluyan dos componentes principales: los costos de control y los costos por falla en el control.

Los costos de control se miden en dos segmentos: *costos de prevención*, que evitan que ocurran defectos e inconformidades y que incluyen los gastos de calidad para evitar que, en primer lugar, surjan productos insatisfactorios. Aquí se incluyen tales áreas de costos como calidad en la ingeniería y capacitación para los empleados. <sup>(29)</sup>

Los *costos de evaluación* incluyen los costos de mantener, los grados de calidad del producto. Ello incluye áreas de costo como inspecciones, pruebas, investigaciones externas, auditorías de calidad y gastos similares.

Los costos por falla en el control , que son causados por los materiales y productos que no satisfacen los requisitos de calidad , se miden también en dos segmentos : *costos por fallas internas*, que incluyen los costos de calidad insatisfactoria dentro de la compañía , tales como desechos, deterioro y material vuelto a trabajar , y los *costos por fallas externas*, que incluyen los costos de calidad insatisfactoria fuera de la compañía, como fallas en el desempeño del producto y quejas de los clientes.

La actuación de las empresas sobre los costos totales de calidad debe ser eficaz y tendente a reducirlos tomándose en consideración los aspectos siguientes:

1. Invertir en actividades de prevención y evaluación para conseguir reducir los fallos.
2. Atacar directamente los fallos visibles.
3. Reducir los costos de evaluación conforme la mejora se vaya haciendo patente.
4. Buscar una nueva orientación a las actividades de prevención para alcanzar la mejora continuada.

Para lograr una reducción significativa en los costos, deben atacarse primero los costos por fallas, lo que tendrá mayor impacto que reducir los costos de evaluación. Un incremento de los costos de prevención significa un ingreso en términos de costos menores por fallas. <sup>(29)</sup>

En el caso de productos que requieren esterilidad, los costos se incrementan. A tal respecto la validación permite disminuir las fallas internas y hacer el trabajo bien desde la primera vez.

### 2.3 Validación en la industria farmacéutica

Desde siempre la vocación de la industria farmacéutica ha sido producir medicamentos de calidad y con total garantía de seguridad. Con los años se han ido desarrollando recomendaciones e incorporando requerimientos que han evolucionado hasta constituir una reglamentación estricta. La industria farmacéutica disfruta de una imagen de calidad excelente. Al elaborar sus productos destinados a curar la enfermedad, salvar vidas o mejorar la calidad de vida, no puede haber el mínimo margen para el error. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos de control y fabricación, se exige una mejora continua y máxima garantía de la calidad. Y es en el avance para conseguir un total dominio de la calidad, cuando surge el concepto de validación.<sup>(4)</sup>

Hoy en día, todos los profesionales de la industria farmacéutica, incluidos los de distribución, mercadotecnia, desarrollo, garantía de calidad, producción, registros, están de acuerdo con el axioma de que *"la calidad no se controla en un producto, la calidad se construye durante su fabricación"*.<sup>(4)</sup>

La calidad del medicamento se consigue en todos y cada uno de los pasos de su proceso de producción, desde su investigación hasta el último análisis sobre el producto final.<sup>(15)</sup> La garantía de la calidad de un producto farmacéutico deriva de una cuidadosa y sistemática atención a todos aquellos factores que pueden influir en su calidad: selección de sus componentes y materiales, diseño de producto y proceso adecuado y control estadístico del proceso.

Alcanzar este nivel de calidad de los medicamentos requiere garantizar que cada una de las etapas de la producción se realiza en forma adecuada y cumpliendo aquellos parámetros de calidad que se han establecido previamente. Y este máximo grado de seguridad tan sólo lo proporcionan los procesos de validación. No hay que olvidar que para obtener medicamentos seguros y eficaces en forma continua, es necesario que su calidad sea constante. Este objetivo sólo se alcanza cuando las especificaciones que se aplican están basadas en procedimientos validados y, por lo tanto, permiten comparar resultados de lotes de reciente fabricación con aquellos que fueron utilizados para ensayos farmacológicos y toxicológicos.<sup>(15-16)</sup>

La documentación es la única evidencia histórica que puede demostrar que el producto se fabricó cumpliendo con las buenas prácticas de manufactura. <sup>(17)</sup>

Es indispensable que la documentación relativa a los estudios de validación esté completa, ordenada y disponible. Además, se debe contar con métodos de análisis validados para producto a granel, producto terminado y materia prima. <sup>(11)</sup>

Los estudios de validación son aplicables a las pruebas analíticas, equipos, sistemas y sistemas críticos (aire, agua, vapor) y procesos (fabricación, limpieza, esterilización, llenado estéril, etc.).<sup>(17)</sup>

Se entiende por proceso a una serie de funciones y actividades mutuamente relacionadas entre sí (en las que intervienen diversas acciones y equipos determinados), que están diseñados para producir un resultado definido. Para validar su reproducibilidad y consistencia, el proceso definido completo se lleva a cabo, utilizando equipos validados de conformidad con el procedimiento establecido, por lo general tres veces como mínimo.

El proceso tendrá que satisfacer en forma adecuada y uniforme todos los criterios de aceptación (cada vez), para que pueda considerársele un proceso validado. En muchos casos se aplican las denominadas “peores condiciones posibles” en la validación, a fin de comprobar que el proceso será aceptable aún en condiciones extremas.

Algunos ejemplos de procesos que deben validarse, son:

- Limpieza
- Desinfección
- Despirogenación
- Esterilización
- Llenado estéril
- Producción
- Liofilización

Los estudios de validación de un proceso se realizan en condiciones normales de operación, a fin de comprobar que están bajo control. Una vez que el proceso se ha validado, cabe esperar que siga bajo control, siempre y cuando no se produzcan modificaciones. Si se hacen ajustes al proceso, si surgen problemas, o si se cambian los equipos o los sistemas que intervienen en el proceso, habrá que revalidar el proceso.

Es imprescindible que, durante todos los estudios de validación de un proceso, estos se efectúen en el ambiente “real” en que tendrá lugar la producción. En otras palabras, todas las actividades periféricas normales asociadas al proceso en cuestión deberán llevarse a cabo mientras se efectúa la validación; por ejemplo, el número de empleados en el establecimiento, procedimientos de entrada y salida que se aplican, monitoreo ambiental y del personal realizado en las fechas prescritas, sistemas de aire funcionando según lo hacen para la fabricación regular, etc.

Aunados a la validación de procesos, se deben realizar pruebas al producto terminado: fisicoquímicas para demostrar pureza, potencia, identidad, desempeño, estabilidad y microbiológicas para demostrar ausencia de contaminación por microorganismos patógenos y no patógenos, en productos estériles y no estériles.

De esta manera, el control microbiológico tiene una gran importancia en la industria farmacéutica; en el caso de aquellos productos que requieren ser estériles, tales como los productos parenterales y los de administración oftálmica, adquieren una vital importancia.

## **2.4 Control microbiológico**

Durante el proceso de fabricación, almacenamiento y uso, los medicamentos son susceptibles de contaminarse con microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras; por consiguiente, se pueden deteriorar. La contaminación de los productos farmacéuticos representa un riesgo para la salud del usuario; este riesgo se relaciona con la severidad de la infección o enfermedad que los

microorganismos contaminantes, patógenos u oportunistas, pueden producir. Por otra parte, el deterioro microbiano podría conllevar a cambios en las características físicas y químicas que conducirían a que el producto no sea apto para ser usado. Es por ello que las materias primas y los productos farmacéuticos terminados deben ser sometidos a un análisis microbiológico que demuestre que cumplen con ciertas especificaciones establecidas por los organismos oficiales; se debe garantizar que los productos sean adecuados para el uso al que están destinados. <sup>(19)</sup>

La pérdida de calidad de un producto, por tanto, puede ser debida a la presencia de microorganismos patógenos o de microorganismos que alteran el producto, de tal manera que lo hagan inadecuado para el consumo. De ahí la necesidad de que todas las industrias conozcan la calidad microbiológica de sus productos, a nivel de las materias primas que usan; es decir que conozcan la calidad de todos los procesos de elaboración y, por supuesto, la calidad del producto final.

En términos microbiológicos, para asegurar la calidad debe monitorizarse el eventual desarrollo microbiano en las materias primas, en el procesado, en los puntos críticos de la cadena de producción y en el producto final. Así, al coste de cualquier producto debe añadirse una cantidad que se invierta en la prevención y mantenimiento.

Este análisis o control microbiológico de las materias primas y de los productos medicamentosos, involucra la realización de dos tipos de ensayos:

- a. Recuentos microbianos, referidos básicamente al recuento total de bacterias aerobias mesófilas al recuento de hongos y levaduras.
- b. Investigación de microorganismos patógenos objetables, llamados también indicadores específicos, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* <sup>(19)</sup>

## **2.5 Validación de métodos microbiológicos**

La validación de un método microbiológico representa un proceso importante para la implementación de una técnica analítica microbiológica, ya que por medio de la validación de dicho método se logra establecer en forma experimental que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para la aplicación prevista.

Para la recuperación e identificación microbiana mediante análisis microbiológicos, las metodologías empleadas en algunas ocasiones son ajustadas a métodos alternativos a los descritos en la USP por diversas razones, incluyendo a las económicas, de producción y conveniencia. Por lo tanto, estos nuevos métodos requieren validación. <sup>(21)</sup>

En los estudios de validación de métodos microbiológicos alternativos es importante tener en cuenta un importante grado de variabilidad. Cuando se llevan a cabo pruebas microbiológicas por conteo en placa convencional, se pueden llegar a encontrar resultados con ciertos porcentajes de desviación, ya que muchos métodos microbiológicos convencionales están sujetos a errores de muestreo, de dilución, de incubación y del operador. La importancia de la validación de las técnicas analíticas en el análisis de un producto es de gran utilidad e importancia y ante todo es parte esencial de las GMP's habida cuenta que es una forma certera y consistente de admitir cuando un proceso está conforme, es exacto y reproducible.

También es un gran aporte a la reducción de costos y a la optimización de procesos, puesto que las técnicas se desarrollan con eficacia, rapidez y seguridad, disminuyendo el tiempo muerto en equipos.

## **2.6 Preparados oftálmicos**

Los preparados destinados al tratamiento de las afecciones oculares se remontan a la antigüedad. Los papiros egipcios describen medicamentos para los ojos. Los griegos y los romanos expandieron estos usos y les dieron el

nombre de colirios. Los colirios se referían colectivamente a materiales que eran disueltos en agua, leche o clara de huevo para ser usados como gotas oftálmicas. En la edad media, los colirios incluían sustancias midriáticas para dilatar las pupilas de las damas con propósitos estéticos; de allí el nombre de belladona o bella dama.

Desde la época de los colirios de belladona la tecnología oftálmica progresó con gran lentitud hasta los tiempos modernos. Recién después de la segunda guerra mundial se hizo obligatorio el concepto de esterilidad para las soluciones oftálmicas. Antes de la segunda guerra mundial y hasta la década de los 40 había muy pocos preparados oftálmicos disponibles en el comercio o descritos oficialmente. La USP XIV, oficializada en 1950, incluía sólo tres preparados oftálmicos y todos eran ungüentos.

Las preparaciones para usar en los ojos, eran soluciones o ungüentos, invariablemente preparados en la farmacia de la comunidad o del hospital y con el propósito de ser utilizados de inmediato (bajo receta). Esas preparaciones y su rápido uso están reflejados en la literatura farmacéutica de la época, en la que la estabilidad de los preparados oftálmicos se comentaba en términos de días o de unos pocos meses.

Uno de los atributos más importantes de los productos oftálmicos es su requisito de esterilidad. Sin embargo, sorprendentemente esto es reciente. En 1955, la USP XV fue el primer compendio oficial que incluyó una disposición de esterilidad para las soluciones oftálmicas. En 1953, la FDA adoptó la postura de que una solución oftálmica no estéril era un producto adulterado. Por supuesto, antes de 1950 había productos oftálmicos estériles; sin embargo, el requisito legal de esterilidad data sólo de 1955.

Los primeros requisitos de esterilidad para ungüentos oftálmicos aparecieron en la USP XVIII, Third Supplement de 1972 (tercer suplemento); antes de esa fecha no había ninguna disposición legal para un ungüento oftálmico estéril, lo que probablemente se debía a la dificultad en esa época para investigar la esterilidad de esos sistemas no acuosos y también a la obvia complicación

para esterilizar y mantener las condiciones de esterilidad durante la elaboración y el envasado de ungüentos a gran escala.<sup>(26)</sup>

## 2.7 Ungüentos oftálmicos

Los ungüentos son preparaciones semisólidas destinadas a la aplicación externa sobre la piel o las membranas mucosas, que contienen el o los fármacos y aditivos incorporados a una base apropiada que le confiere una masa y consistencia. La base puede ser liposoluble o hidrosoluble, generalmente es anhidra o con un máximo de 20% de agua. Cuando contiene una base lavable o que se remueve con agua se le denomina también ungüento hidrofílico.<sup>(24)</sup>

Los ungüentos oftálmicos se aplican en los ojos. En la preparación de los ungüentos oftálmicos deben tomarse precauciones especiales: estos se fabrican a partir de ingredientes esterilizados en condiciones asépticas estrictas y deben cumplir con los requisitos de las pruebas de esterilidad. Si los ingredientes específicos empleados en la formulación no se prestan para someterse a las técnicas de esterilización de rutina, podemos emplear los ingredientes que cumplen con los requisitos de esterilidad descritos en pruebas de esterilidad los cuales se pueden utilizar junto con un método de fabricación aséptico. Los ungüentos oftálmicos deben contener una sustancia o mezcla de sustancias adecuadas para destruir o impedir la proliferación de microorganismos que se introducen accidentalmente cuando el envase se abre durante el uso, a menos que se indique algo diferente en la monografía individual correspondiente o que la fórmula misma sea bacteriostática.

El ungüento terminado debe cumplir con los requisitos de tamaño de partícula y ausencia de partículas metálicas en ungüentos oftálmicos. Los envases primarios para ungüentos oftálmicos deben ser estériles al momento de llenarlos y cerrarlos; es obligatorio que estos envases se sellen.<sup>(20)</sup>

La prueba de esterilidad para ungüentos oftálmicos se ha visto muy facilitada por el uso de las membranas estériles que retienen microorganismos

(habitualmente se usan las que tienen una porosidad nominal de 0,22 o 0,45  $\mu\text{m}$ ). Para los ungüentos solubles en miristato de isopropilo (el solvente usado en la prueba oficial de esterilidad), se disuelve una muestra del ungüento en un solvente de prueba estéril. Para los ungüentos insolubles en miristato de isopropilo, la muestra se suspende en un vehículo acuoso conveniente, que puede contener un agente dispersante y se realiza la prueba mediante el procedimiento convencional. <sup>(26)</sup>

## 2.8 Peligros de productos oftálmicos no estériles

La posibilidad de infección ocular grave asociada al uso de productos oftálmicos contaminados está ampliamente documentada en la literatura especializada. Estos productos muchas veces han sido responsables de úlceras corneales y de pérdida de la visión. Se han hallado productos oftálmicos contaminados en consultorios médicos y clínicas oftalmológicas, así como dispensadas bajo receta en farmacias comunitarias y hospitalarias. Los microorganismos contaminantes hallados con mayor frecuencia pertenecen al grupo de los estafilococos. *Pseudomonas aeruginosa* es otro contaminante menos frecuente y la solución contaminada más a menudo por este microorganismo es la fluoresceína sódica.

*Pseudomonas aeruginosa* (*B. pyocyaneus*; *Pseudomonas pyocyanea*; bacilo pociánico). Este es un microorganismo oportunista muy peligroso que crece bien en la mayoría de los medios de cultivo y produce toxinas y productos antibacterianos. Estos últimos tienden a destruir a los otros contaminantes y permiten que *P.aeruginosa* crezca en cultivo puro. Este bacilo Gram negativo también crece rápidamente en productos oftálmicos, los que se pueden convertir en una fuente de infecciones sumamente grave para la córnea y que pueden causar la pérdida completa de la visión en 24-48 h. En concentraciones toleradas por los tejidos del ojo, aparentemente todos los agentes antimicrobianos serían ineficaces frente a algunas cepas de este microorganismo. <sup>(26)</sup>

Una solución oftálmica estéril en un envase multidosis puede contaminarse de diversas maneras, salvo que se adopten las precauciones adecuadas, por ejemplo, si se usa un frasco gotero, la punta de este puede tocar la superficie de una mesa o tocar los párpados o las pestañas del paciente durante la administración; así mismo el borde de la tapa puede tocar una mesa o un dedo y luego el extremo del gotero al volverse a tapar el frasco. <sup>(26)</sup>

El producto puede contener un antimicrobiano eficaz, pero el siguiente uso del producto contaminado puede producirse antes de que haya pasado el tiempo suficiente como para que mueran todos los microorganismos; por obvio estos seres vivos podrían ingresar a través de alguna abrasión en el estroma corneano. Una vez en éste, todos los vestigios residuales del agente antimicrobiano son neutralizados por los componentes tisulares y los microorganismos encuentran un excelente medio de cultivo para su rápido crecimiento y diseminación a través de la córnea y el segmento anterior del ojo. <sup>(26)</sup>

*Bacillus spizizenii* puede producir un absceso grave si infecta el humor vítreo. El hongo patógeno considerado de particular importancia en los productos oculares es *Aspergillus fumigatus*. Otros hongos pueden resultar nocivos porque aceleran el deterioro de los fármacos. Otros patógenos más extendidos en conjuntiva son los estafilococos, estreptococos, *Haemophilus sp*, coliformes y anaerobios. <sup>(27)</sup>

## **2.9 Uso de los conservadores para los productos oftálmicos**

Como se mencionó anteriormente, es muy importante que los ungüentos oftálmicos sean estériles para evitar una nueva lesión al ojo enfermo, los ungüentos oftálmicos deben contener una sustancia o mezcla de sustancias adecuadas para impedir el crecimiento de microorganismos o para destruir a los introducidos accidentalmente, cuando se abre el envase durante su uso; por tal razón, es preferible elaborar los ungüentos oftálmicos en frascos monodosis. Empero esto representa un elevado costo de fabricación y acondicionamiento; en ciertos casos, cuando el tratamiento es por algunos días, resulta poco práctico su transporte y un costo mayor para el consumidor,

por lo cual, generalmente se envasan en frascos multidosis. Debido a que el envase se abre desde el primer uso, debe tener una sustancia o serie de sustancias que impidan el crecimiento de los microorganismos introducidos accidentalmente al abrir el envase y/o por la manipulación posterior; para evitar su contaminación durante su periodo de vida útil, es imprescindible agregar conservadores.

La necesidad de un control correcto de los productos oftálmicos para evitar contaminaciones graves ya era reconocida en la década de 1930. El primer conservador recomendado para usarse en productos oftálmicos fue el clorobutanol. Los agentes antimicrobianos más usados actualmente son clorobutanol, parabenos o uno de los mercuriales orgánicos como es el caso del nitrato fenilmercúrico.

Debido a la cantidad escasa de conservadores empleados en uso oftálmico, la elección del conservador adecuado suele ser difícil; por supuesto, no existe un conservador ideal y el elegido debe cumplir con ciertas características:

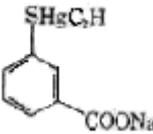
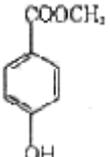
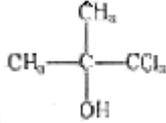
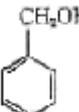
1. Debe poseer un amplio espectro y ser activo contra microorganismos Gram positivos, Gram negativos y hongos; además debe ejercer una rápida actividad bactericida, en especial para microbios de reconocida virulencia como *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Debe ser estable bajo una amplia gama de situaciones, incluidas las temperaturas de autoclave y los intervalos de pH.
3. Debe establecerse su compatibilidad con otros componentes del preparado y los sistemas de envasado.
4. Debe establecerse su falta de toxicidad y de irritación con un margen de seguridad razonable. <sup>(26)</sup>

Las sustancias conservadoras deben ser evaluadas como parte del preparado oftálmico total en el envase propuesto. Sólo de esta forma es posible establecer la eficacia del conservador adecuado. La USP incluye una prueba

para establecer la eficacia del conservador; además, algunos fabricantes han descrito un panel de microorganismos de prueba para ensayar y verificar la actividad conservadora.

Los conservadores utilizados para uso oftálmico son limitados ya que en cada caso, hay inconvenientes y limitaciones (Tabla 1).

**Tabla 1. Conservadores para soluciones oftálmicas.** <sup>(26)</sup>

Tipo	Estructura típica	Concentración	Incompatibilidades
Compuesto de amonio cuaternario	$\left[ \begin{array}{c} R_2 \\   \\ R_1 - N - R_3 \\   \\ R_4 \end{array} \right]^{+}$	0,004-0,02%  0.01%	Jabones. Materiales aniónicos. Nitratos. Salicilatos
Mercuriales orgánicos		0.001-0.01%	Ciertos haluros con acetato fenilmercúrico.
Parahidroxi benzoatos		Máximo 0.1 %	Adsorción por macromoléculas: actividad marginal.
Clorobutanol		0.5%	Estabilidad dependiente del pH, concentración activa cercana al máximo de solubilidad
Alcoholes aromáticos		0.5-0.9%	Poca solubilidad en agua; actividad marginal

Los conservadores contenidos en los ungüentos de prueba son clorobutanol, metilparabeno y propilparabeno; en algunos productos oftálmicos evaluados no se emplea el uso de conservadores, ya que su principio activo actúa como antimicrobiano.

### **2.9.1 Alcoholes y fenoles sustituidos**

El clorobutanol, que es eficaz frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, incluidos *P.aeruginosa* y algunos hongos, es ampliamente compatible con otros componentes y por lo general se usa en una concentración del 0.5%. Uno de sus productos de hidrólisis es el ácido clorhídrico, que produce un descenso de pH de las soluciones acuosas. Esta descomposición ocurre rápidamente a altas temperaturas y lentamente a temperatura ambiente, en soluciones sin solución amortiguadora o que originalmente eran neutras o alcalinas. Por consiguiente, las soluciones oftálmicas que contienen clorobutanol deben tener solución amortiguadora entre pH 5,0 y 5,5. A temperatura ambiente la solución se disuelve lentamente en agua y, aunque se disuelve más rápidamente al ser calentada, así se aceleran las pérdidas por vaporización y la descomposición. <sup>(26)</sup>

### **2.9.2 Esteres del Ácido Parahidroxibenzoico**

A veces se usan mezclas de Metilparabeno y Propilparabeno como conservadores antimicrobianos oftálmicos; la concentración de Metilparabeno es del orden de 0,1-0,2%, mientras que la del Propilparabeno se aproxima a la de su solubilidad en agua (aproximadamente 0,04%).

Estas sustancias no se consideran bacteriostáticas eficaces y su acción antimicrobiana es lenta. Se han comunicado casos de irritación y picazón ocular atribuidos a su empleo en preparados oftálmicos. <sup>(26)</sup>

## **2.10 Prueba de esterilidad**

Las farmacopeas en general aceptan que un producto es estéril si cumple con la prueba de esterilidad y la definición más estricta de esterilidad es la ausencia total de cualquier forma de vida y su término es absoluto. El proceso mediante el cual se logra es la "esterilización" y se define como "el proceso de eliminar toda forma de vida". La esterilidad de un lote se define en términos probabilísticos, en donde la posibilidad de encontrar un artículo o unidad contaminada es aceptablemente remota.

La prueba se aplica a sustancias, preparaciones o artículos cuya esterilidad es requerida por la farmacopea. Sin embargo un resultado satisfactorio únicamente indica que no se han encontrado microorganismos contaminantes en la muestra examinada bajo las condiciones de prueba. <sup>(23)</sup>

## **2.11 Validación de la prueba de esterilidad**

La prueba de esterilidad requiere la validación de los métodos de recuperación. Para asegurar que los resultados de las pruebas sean confiables, se requiere la neutralización de las propiedades antimicrobianas de la solución de prueba antes de calcular el número de microorganismos viables.

La prueba de esterilidad se lleva a cabo bajo condiciones asépticas, por lo que, para lograr tales condiciones, el entorno de la prueba debe adaptarse a la manera en que esta se realice. Las precauciones para evitar la contaminación se deben tomar de modo tal que no afecte a ningún microorganismo que deba detectarse en esta prueba. Las condiciones de trabajo en las que se efectúan las pruebas se monitorean regularmente mediante el muestreo adecuado del área de trabajo y la realización de controles apropiados.

Varios factores afectan la determinación de la actividad antimicrobiana de una solución de prueba y deben considerarse en el diseño de la validación. Estos incluyen la naturaleza de los microorganismos utilizados como organismos de desafío, la preparación del inóculo de los organismos de desafío, las

condiciones específicas de la prueba y las condiciones de recuperación para productos acuosos o no acuosos, independientemente de sus propiedades antimicrobianas. De este modo, todos los métodos de prueba deben ser validados con estos factores en mente.

La naturaleza del microorganismo de desafío ejerce un gran efecto sobre la respuesta al agente antimicrobiano y por lo tanto, sobre la neutralización requerida para la recuperación. Entre estos microorganismos de prueba farmacopeica se encuentran bacterias Gram positivas, bacterias Gram negativas, levaduras y hongos y cada microorganismo que se utilice en la prueba debe ser incluido en la validación.

La preparación del inóculo de microorganismos de desafío también afecta la prueba de productos que tengan actividad antimicrobianas. El cultivo y preparación del organismo de desafío determina el estado fisiológico de la célula y este estado influye directamente sobre los resultados de cualquier prueba de eficacia antimicrobiana. Las pruebas microbianas no utilizan células individuales; se recolectan más bien poblaciones de células para su estudio. Los datos generados en estos estudios son menos variables si las poblaciones de células son homogéneas. Los cultivos líquidos o los cultivos confluentes en medios sólidos son más adecuados para la preparación de cultivos reproducibles, las condiciones de preparación y almacenamiento del microorganismo deben ser estandarizados para la evaluación del neutralizante y deben reflejar las condiciones de la valoración antimicrobiana.

Las condiciones específicas de la prueba, incluyendo soluciones amortiguadoras utilizadas, agua, condiciones de luz y temperatura deben ser reproducidas en el estudio de validación, también deben estandarizarse y cumplirse todas las condiciones de prueba en el estudio de la validación exactamente como se realizaron en la prueba.

Las condiciones de recuperación microbiana están dentro de las más cruciales para calcular con exactitud el número de microorganismos presentes en una solución de prueba. La primera consideración es el medio de recuperación

utilizado para permitir el crecimiento de sobrevivientes, la segunda consideración se refiere a las condiciones de incubación. Las condiciones óptimas de crecimiento deben estar presentes para asegurar el crecimiento completo y resultados reproducibles. <sup>(21)</sup>

## **2.12 Métodos de validación de las pruebas de esterilidad**

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos indica dos métodos para realizar la prueba de esterilidad.

### **2.12.1 Inoculación directa del medio de cultivo**

En el método por inoculación directa, una cantidad determinada de la preparación a examinar se transfiere directamente, al medio de cultivo indicado; en el caso de los ungüentos oftálmicos se realiza una dilución aproximadamente de 1:10, emulsionando con el agente elegido en un eluyente estéril adecuado. Para realizar la validación se deben inocular los medios individualmente con no más de 100 UFC de cada uno de los microorganismos de prueba, y se incuba bajo las condiciones indicadas en la FEUM (Tabla 6).  
(23,25)

### **2.12.2 Filtración por membrana**

En el método de filtración se filtra el producto a través de una membrana con un tamaño nominal de poro no mayor de 0.45  $\mu\text{m}$ , cuya eficacia para retener microorganismos haya sido establecida. Los ungüentos oftálmicos en base grasa y las emulsiones del tipo agua en aceite pueden diluirse al 1% en miristato de isopropilo, calentando si fuera necesario a no más de 44°C. Se debe filtrar tan rápido como sea posible y proceder con la metodología indicada; es importante que el aparato de filtración y las membranas estén estériles. Después de filtrado el producto, se hace pasar solución de enjuague y la última porción de esta solución (aproximadamente 100 mL) se inocula con no más de 100 UFC de uno de los microorganismos de prueba y se incuba por el tiempo indicado en la FEUM (Tabla 6).

**Fig.1 Embudos de filtración**



### **2.12.3 Sistema Steritest**

Una variación del método de filtración en membrana, es el uso de un sistema cerrado como el sistema Steritest® (Figura 3). El sistema utiliza un juego de canastillas estériles que portan un par de membranas filtrantes de 0.45  $\mu\text{m}$  (Figura 2).

**Figura 2. Canastillas Steritest para análisis de muestra.**



Estas canastillas están conectadas por medio de mangueras estériles las cuales transportan el producto gracias a la acción de una bomba peristáltica de alta precisión. El producto es transferido directamente desde el envase y, durante la transferencia, el líquido es automáticamente dividido en partes iguales y filtrados en dos de las canastillas. Posteriormente al enjuague, dos

distintos medios de cultivo son introducidos secuencialmente a cada cámara filtrante, eliminando así la transferencia externa de las membranas. Las campanas selladas son posteriormente incubadas a temperaturas especificadas en las correspondientes farmacopeas.

La ventaja de usar este equipo, en comparación con el sistema que utiliza embudos de filtración, es que el producto ni las soluciones de enjuague, están expuestos al medio ambiente; no se manipula la membrana de filtración, por lo que se reducen los falsos positivos debido a contaminación externa. Cada lote de canastillas cuenta con un certificado de análisis que incluye ensayos físicos y biológicos. Las unidades Steritest de Millipore simplifican cada aspecto del análisis, desde la manipulación hasta la trazabilidad, en un sistema cerrado. La facilidad de uso y conveniencia de este sistema cerrado permiten aumentar la productividad y mantener los niveles más altos de calidad y fiabilidad. <sup>(28)</sup>

**Figura 3. Equipo Steritest compact.**



La FEUM indica que el método de filtración por membrana se debe utilizar siempre que la naturaleza del producto lo permita, es decir, para preparaciones acuosas filtrables, para preparaciones alcohólicas o aceitosas y para preparaciones miscibles con, o solubles en, disolventes acuosos o aceitosos, siempre que dichos disolventes no posean un efecto antimicrobiano en las condiciones de prueba. <sup>(25)</sup>

La FEUM establece que los microorganismos de prueba para los métodos de análisis antes mencionados son 6, incluyendo bacterias no esporuladas (*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), bacterias esporuladas, una aerobia y otra anaerobia (*Bacillus subtilis* y *Clostridium sporogenes*, respectivamente), un hongo filamentoso (*Aspergillus brasiliensis*) y la levadura (*Candida albicans*).

Además, se debe llevar un control estricto de los medios de cultivo empleados en la prueba (medio líquido de tioglicolato y medio de digerido de caseína y soya), porque constituyen la base de la mayoría de las pruebas microbiológicas (incluyendo la validación de las pruebas de esterilidad) y es de suma importancia que se proteja su calidad para lograr resultados exitosos y confiables en el laboratorio microbiológico.

Con respecto a la interpretación de los resultados, indica la FEUM que si después de la incubación se obtiene un crecimiento claramente visible de microorganismos, comparable visualmente con el del recipiente control sin producto, el producto no posee actividad antimicrobiana en las condiciones de la prueba o tal actividad se ha neutralizado satisfactoriamente. Por lo tanto la prueba de esterilidad puede llevarse a cabo sin modificaciones.

Si no se obtiene un crecimiento claramente visible en presencia del producto a evaluar, comparable visualmente con el de los recipientes de control sin producto, se interpreta que el producto posee actividad antimicrobiana eliminada satisfactoriamente bajo las condiciones de la prueba y, por tanto, deberán de modificarse las condiciones de prueba, con el fin de eliminar la actividad antimicrobiana y repetir la validación del método. <sup>(23,25)</sup>

## 2.13 Neutralización de conservadores

En virtud de que se debe eliminar cualquier sustancia que interfiera con la detección de los microorganismos, la neutralización de los conservadores presentes en los productos farmacéuticos utiliza tres métodos comunes:

### ❖ Inhibición química

La inhibición química de bactericidas es el método preferido para la prueba de eficacia antimicrobiana. El potencial de utilidad de los inhibidores químicos se debe considerar en las pruebas de esterilidad por filtración por membrana y por transferencia directa; la Tabla 2 se muestra los neutralizantes conocidos para diversos agentes antimicrobianos químicos.

### ❖ Dilución

Un segundo enfoque para neutralizar las propiedades antimicrobianas de un producto es a través de la dilución, considerando que la concentración de un bactericida químico correlaciona con su potencia. La relación entre la concentración y el efecto antimicrobiano difiere entre los agentes bactericidas, pero es constante para cada agente antimicrobiano.

### ❖ Filtración por membrana

La neutralización mediante filtración por membrana se basa en la retención física del microorganismo en la membrana filtrante, mientras el agente antimicrobiano pasa a través del filtrado. Luego, se incuba la membrana para la recuperación de los microorganismos viables. Sin embargo, la filtración puede no eliminar cantidades suficientes del agente bactericida como para impedir el crecimiento de los microorganismos sobrevivientes. La adherencia de los agentes antimicrobianos residuales a la membrana puede inhibir su crecimiento. Por ello la filtración a través de materiales filtrantes de poca capacidad de unión ayuda a minimizar esta indeseable inhibición del crecimiento. Además, el conservador puede diluirse o eliminarse del filtro por lavado con un líquido propicio. Los neutralizantes químicos en el líquido de

enjuague pueden asegurar que los residuos antimicrobianos que persisten en la membrana no interfieran con la recuperación de microorganismos viables. <sup>(21)</sup>

**Tabla 2. Muestran los neutralizantes conocidos para diversos agentes antimicrobianos químicos y la toxicidad informada de algunos neutralizantes químicos para microorganismo específicos.**

<b>Neutralizante</b>	<b>Tipo de biocida</b>	<b>Acción potencial de biocidas</b>
<b>Bisulfato</b>	<b>Glutaraldehído, mercuriales.</b>	<b>Bacterias no esporuladas</b>
<b>Dilución</b>	<b>Fenólicos, alcohol, aldehídos, sorbato.</b>	<b>-----</b>
<b>Glicina</b>	<b>Aldehídos</b>	<b>Células en crecimiento</b>
<b>Lecitina</b>	<b>Compuestos de amonio cuaternario, Parabenos, Bis-biguanidas</b>	<b>Bacterias</b>
<b>Iones Mg<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup></b>	<b>EDTA</b>	<b>-----</b>
<b>Polisorbato</b>	<b>Compuestos de amonio cuaternario, Yodo, Parabenos</b>	<b>-----</b>
<b>Tioglicolato</b>	<b>Mercuriales</b>	<b>Estafilococos y esporas</b>
<b>Tiosulfato</b>	<b>Mercuriales, Halógenos, Aldehídos</b>	<b>Estafilococos</b>

## Capítulo 3. Diseño experimental

### 3.1 Material, soluciones, medios de cultivo y equipo

#### 3.1.1 Materiales

##### Material estéril

- ♦ Cajas petri con Agar Soya Trypticaseína (AST)
- ♦ Botella Roux con Agar Soya Trypticaseína (AST)
- ♦ Botella para medio de cultivo, capacidad 1L
- ♦ Botellas de vidrio. Schott Duran 500 mL con tapón de rosca
- ♦ Pinzas Millipore
- ♦ Agitador magnético
- ♦ Puntas para micropipeta
- ♦ Tubos de ensaye Pirex 16X150 mm y 38 X 200mm
- ♦ Perlas de vidrio.

La esterilización se realizó por autoclave.

- ♦ Asa microbiológica. Se esteriliza antes de cada uso por calor. (al rojo vivo)

##### Material estéril desde su adquisición

- ♦ Guantes
- ♦ Cajas petri desechables
- ♦ Canastillas Steritest™. TTHAPC210. Millipore

##### Material no estéril

- ♦ Micropipeta 10-1000 µL Gilson
- ♦ Gradillas
- ♦ Probeta de 50 mL. Pirex
- ♦ Cubrebocas. Desechable
- ♦ Cofias. Desechable
- ♦ Puente para tinción
- ♦ Goteros
- ♦ Portaobjetos
- ♦ Jarra de anaerobiosis
- ♦ Tiras para producir anaerobiosis. Anaerocult A. Merck™.num:113829
- ♦ Indicador de anaerobiosis. Anaerotest.Merck™ Núm. de producto 115112

### 3.1.2 Soluciones

- ♦ Reactivos

- Miristato de isopropilo (MIP). Merck™. Cat. 8.22102.2500
- Polisorbato 80

- ♦ Reactivos para tinción Gram

- Cristal violeta. Becton Dickson. Cat. 212525
- Safranina. Becton Dickson. Cat. 212531
- Solución decoloradora. Becton Dickson. Cat. 212527
- Solución estabilizadora (yodo) Gram. Becton Dickson. Cat. 212542

Las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua purificada.

- ♦ Solución salina estéril 0.85%. NaCl
- ♦ Solución salina estéril 0.85% NaCl más tween 80 (5,0 mL/L)
- ♦ Solución IV FEUM. Solución de peptona , Extracto de carne y polisorbato 80

Preparadas a partir de:

- ♦ Peptona de carne. Merck™.Cat. 107224
- ♦ Bacto™ proteose peptone No.3.Merck™. Cat. 211693
- ♦ Cloruro de sodio cristal. J.T.Baker™. Cat 3624-01

### 3.1.3 Medios de cultivo.

- ♦ Agar Soya Trypticaseina. Agar CASO Merck™. Cat. 105458
- ♦ Caldo Soya Trypticaseina. Caldo CASO Merck™ Cat. 105459
- ♦ Medio Fluido de Tioglicolato. Difco™ Fluid Thioglicollate Médium. Cat.225650

### 3.1.4 Equipos.

- ♦ Espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer Lambda 2.e
- ♦ Balanza analítica. Mettler toledo. Modelo PB 5001-S
- ♦ Autoclave. Finn-aqua modelo 666
- ♦ Campana de flujo laminar. Veco GHFL –A12
- ♦ Equipo Steritest® Compact Millipore
- ♦ Microscopio Óptico. Carl Zeiss modelo K-7
- ♦ Contador de colonias. Optical Word Ltd. Modelo ERMA.
- ♦ Incubadora industrial Figursa 20-25°C. Modelo IFD-180

- ♦ Incubadora industrial Figursa 30-35°C.. Modelo IFD-180
- ♦ Refrigerador. Revco Modelo RELI204A21
- ♦ Baño de agua.Blue M. Modelo MW-1130A-1
- ♦ Vortex.Genie 2
- ♦ Parrilla con agitación. Marca VWR.
- ♦ Potenciómetro SCHOT .Modelo LAB-870
- ♦ Balanza analítica Mettler Toledo. Modelo PB5001-5

### 3.2 Material biológico

Los microorganismos utilizados durante la validación del método analítico fueron los siguientes:

**Tabla 3. Microorganismos utilizados en la Validación. La procedencia de las cepas utilizadas fue MicroBioLogics®**

<b>Microorganismos de prueba.</b>	<b>ATCC</b>	<b>Catalogo</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	0485
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	0484
<i>Clostridium sporogenes</i>	11437	0487
<i>Bacillus spizizenii</i>	6633	0486
<i>Candida albicans</i>	10231	0443
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	16404	0392

## **Capítulo 4. Metodología**

### **4.1 Preparación de soluciones y medios de cultivo**

#### **4.1.1 Soluciones**

- Solución IV. Solución de peptona y extracto de carne con polisorbato 80.

Se disolvió 5,0 gramos de peptona de carne, 3,0 gramos de extracto de carne y 10,0 ml de polisorbato 80 en 1000,0 mL de agua purificada, se ajustó el pH a  $6.9 \pm 0.2$ , se envasaron 800,0 mL en frascos con capacidad de 1000,0 mL y se esterilizaron.

- Solución de cloruro de sodio al 0.85 %.

Se colocaron 8,5 g de cristales de cloruro de sodio en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en 1000,0 mL de agua purificada, de la solución anterior, se toman porciones de 9,0 mL y se depositaron en tubos de ensaye de 16x150 mm con tapa de rosca para su posterior esterilización en autoclave.

- Solución de cloruro de sodio al 0.85 % mas tween 80 (5,0 mL/L)

Se colocaron 8,5 g de cristales de cloruro de sodio en un matraz Erlenmeyer y se disolvieron en 1000 mL de agua purificada y se adicionó 5,0 mL de polisorbato 80 (Tween 80), de la solución anterior, se toman porciones de 9,0 mL y se depositaron en tubos de ensaye de 16x150 mm con tapa de rosca para su posterior esterilización en autoclave.

#### **4.1.2 Prueba de esterilidad a soluciones.**

La esterilidad se comprobó por incubación de porciones representativas de los lotes preparados, 7 días a 30-35°C y 7 días a 20-25°C

#### **4.1.3 Medios de cultivo y su control de calidad.**

Los medios de cultivo se prepararon a partir de formulaciones deshidratadas dentro del laboratorio, siguiendo las indicaciones del fabricante, posteriormente se esterilizaron en autoclave que cuenta con ciclos validados, para los medios sólidos se realizó el vaciado en placa dentro de la campana de flujo laminar, el Caldo Soya Trypticaseína y el Medio Fluido de Tioglicolato se envasaron en tubos con tapón de rosca y frascos para medio de cultivo, posteriormente fueron esterilizados. Las pruebas para el control de calidad de los medios de cultivo utilizados, incluyeron las pruebas de promoción de crecimiento, esterilidad y determinación del pH.

Se realizó la prueba de esterilidad de los medios de cultivo utilizados, incubando una porción representativa (10%) de cada lote a las temperaturas especificadas: el Caldo Soya Trypticaseína se incubó a 20-25°C, el Medio Fluido de Tioglicolato se incubó a 30-35°C, ambos por un periodo de 14 días. La prueba se considera satisfactoria si no se observa crecimiento en el medio de cultivo, si es medio líquido no se debe observar turbidez, si es sólido, no se deben observar Unidades Formadoras de Colonias.

#### **4.1.4 Determinación del pH.**

Antes de tomar el pH de los medios, se calibra el equipo con las soluciones amortiguadoras de 4,0 y 7,0. La determinación del pH de los medios de cultivo se realizó para cada lote de medio de cultivo preparado en el laboratorio, después de su esterilización en autoclave, se toma la lectura a una temperatura de 25°C.

## **4.2 Preparación de suspensiones de cada microorganismo de prueba.**

### **4.2.1 Suspensiones estandarizadas de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.**

Se sembraron las cepas ATCC de bacterias sobre placas, con Agar soya Trypticaseína y se incubaron a 30-35°C por 24 hrs y de 20-25°C por 48 horas para levaduras. Se recuperó el crecimiento con 100,0 mL de solución salina estéril al 0.85% y se preparó una suspensión aproximadamente al 60% de transmitancia a 580 nm, en tubos con tapón de rosca estériles. Obtenidas las suspensiones a una transmitancia aproximada, se realizaron diluciones seriadas de cada microorganismo en tubos de ensaye estériles que contenían 9,0 mL de solución salina estéril al 0.85%.

La cuantificación de los microorganismos presentes en las suspensiones preparadas se realizó por duplicado mediante el método de vertido en placa, el cual consistió en colocar 1,0 mL de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  sobre cajas petri estériles y verter aproximadamente 25,0 mL de medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína, con movimientos circulares se distribuyó uniformemente el medio sobre la caja petri, gelificó el medio a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron las placas para el grupo de bacterias y para la levadura *C. albicans*, la temperatura de incubación fue de 30-35°C durante 3 días.

Después del periodo de incubación, se realizó la cuenta de las UFC presentes en cada placa y se obtuvo un promedio el cual permitió determinar la dilución y el volumen en donde se obtuvieran concentraciones de alrededor de 10 -100 UFC/ml de microorganismos viables.

### **4.2.2 Suspensión estandarizada de *Aspergillus brasiliensis***

Se inoculó la cepa ATCC de *Aspergillus brasiliensis* dentro de una botella Roux con 250 mL de Agar Dextrosa Sabouraud bajo una temperatura de incubación de 20-25°C por un periodo de 7 a 10 días con la finalidad de obtener el mayor número de esporas, una vez finalizado el periodo de incubación se adicionaron

10-15 mL de solución salina estéril al 0.85% adicionada de polisorbato 80 (5,0mL/L) al 0.05%, se adicionaron perlas de vidrio estériles y homogeneizó para remover las esporas, el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo limpio, posteriormente se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensaye estériles que contenían 9,0 mL de solución salina al 0.85%.

La cuantificación de los microorganismos presentes en las suspensiones preparadas se realizó por duplicado mediante el método de vertido en placa, el cual consistió en colocar 1 mL de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  sobre cajas petri estériles y verter aproximadamente 25,0 mL de medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína, con movimientos circulares se distribuyó uniformemente el medio sobre la caja petri, gelificó el medio a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron las placas de 20-25°C durante 5 días.

Después del periodo de incubación, se realizó la cuenta de las UFC presentes en cada placa y se obtuvo un promedio el cual permitió determinar la dilución y el volumen en donde se obtuvieran concentraciones de alrededor de 10 -100 UFC/ml de microorganismos viables.

#### **4.2.3 Suspensión estandarizada de *Bacillus spizizenii***

La cepa ATCC de *Bacillus spizizenii* se inoculó en una placa de Agar Soya Trypticaseína y se incubó a 30-35°C de 18-24 horas, una vez finalizado el periodo de incubación se lavó la placa con aproximadamente 3,0 mL de solución salina estéril al 0.85%. Se inoculó esta suspensión dentro de una botella de Roux con 250,0 mL de Agar Soya Trypticaseína estéril y se incubó la botella a 30-35°C en un periodo de 7-14 días, el crecimiento microbiano obtenido fue resuspendido adicionando 35,0 mL de solución salina al 0.85% estéril, y se colectó en un frasco estéril, fue colocado en agitación constante durante aproximadamente 3 horas, se retiró de la agitación, con ayuda de una gasa estéril y un filtro estéril se filtró la suspensión esta se calentó a una temperatura de 70°C durante 30 minutos, transcurrido el tiempo de calentamiento, inmediatamente se colocó en refrigeración con la finalidad de detener el choque térmico y obtener las esporas y destruir de esta manera cualquier otra forma vegetativa presente. Se

realizaron diluciones seriadas del microorganismo en tubos de ensaye estériles que contenían 9,0 mL de solución salina estéril al 0.85%.

La cuantificación de los microorganismos presentes en las suspensiones preparadas se realizó por duplicado mediante el método de vertido en placa, el cual consistió en colocar 1 mL de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  sobre cajas petri estériles y verter aproximadamente 25,0 mL de medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína, con movimientos circulares se distribuyó uniformemente el medio sobre la caja petri, gelificó el medio a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron las placas, la temperatura de incubación fue de 30-35°C durante 2-4 días.

Después del periodo de incubación, se realizó la cuenta de las UFC presentes en cada placa y se obtuvo un promedio el cual permitió determinar la dilución y el volumen en donde se obtuvieran concentraciones de alrededor de 10 -100 UFC/ml de microorganismos viables.

#### **4.2.4 Suspensión estandarizada de *Clostridium sporogenes***

Se inoculó un frasco de Medio Fluido de Tioglicolato con la cepa ATCC de *Clostridium sporogenes* y se incubó a 30-35°C por 72 h. Una vez obtenido el crecimiento, se dejó que el microorganismo esporulara, dejando el cultivo a temperatura ambiente por una semana aproximadamente, se verificó la formación de esporas realizándole una tinción de Gram al cultivo.

Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en tubos de ensaye estériles que contenían 9,0 mL de solución salina al 0.85%.

La cuantificación de los microorganismos presentes en las suspensiones preparadas se realizó por duplicado mediante el método de vertido en placa, el cual consistió en colocar 1,0 mL de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  sobre cajas petri estériles y verter aproximadamente 25,0 mL de medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína, con movimientos circulares se distribuyó uniformemente el medio sobre la caja petri, gelificó el medio a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron las placas, la temperatura de incubación fue de

30-35°C durante 2-4 días en condiciones de anaerobiosis dichas condiciones se establecieron mediante el uso de las tiras para producir anaerobiosis. Anaerocult A. Merck™.

Después del periodo de incubación, se realizó la cuenta de las UFC presentes en cada placa y se obtuvo un promedio el cual permitió determinar la dilución y el volumen en donde se obtuvieran concentraciones de alrededor de 10 -100 UFC/ml de microorganismos viables.

#### 4.3 Selección de las muestras.

De acuerdo a la FEUM 9ª Ed, la prueba de esterilidad para productos oftálmicos cuando se realiza por el método de filtración por membrana siempre que sea posible se debe utilizar todo el contenido del envase, pero no menos de la cantidad indicada (tabla 4).

Por otro lado, el número de artículos a examinar se indica en la tabla 5 . La validación se realiza en tres corridas para cada producto, en este trabajo se utilizaron lotes diferentes de cada uno de los productos validados (1-3 lotes).

**Tabla 4. Cantidad mínima del producto a usar para cada medio de cultivo. <sup>(27)</sup>**

Cantidad de producto por envase.	Cantidad mínima a tomar por envase para cada medio de cultivo (a menos que se autorice y justifique otra indicación)
<b>LIQUIDOS.</b>	
<b>Menos de 1 mL.</b>	<b>Todo el contenido.</b>
<b>De 1 mL a 40 mL.</b>	<b>La mitad del contenido, pero no menos de 1 mL</b>
<b>De 41 mL a menos de 100mL.</b>	<b>20 mL</b>

Mayor a 100mL	10 por ciento del contenido del envase, pero no menos de 20 mL.
Preparaciones solubles en agua o en miristato de isopropilo	Contenido total de cada envase para obtener no menos de 200 mg

Tabla 5. Cantidad mínima de artículos a usar para la prueba en relación con el tamaño del lote. Para oftálmicos y productos no parenterales. <sup>(27)</sup>

Número de artículos del lote. (Envases o contenedores.)	Número mínimo de artículos recomendados para cada medio de cultivo (a menos que se justifique y autorice otra indicación)
No más de 200.	5 por ciento o 2 envases, lo que sea mayor.
Más de 200	10

Los ungüentos oftálmicos deben ser solubilizados en Miristato de Isopropilo

Número de artículos de prueba por cada medio de cultivo (Tabla 5):

10 artículos

En este caso la FEUM indica el uso de dos medios de cultivo MFT y AST, por tanto:

2 medios de cultivo × 10 artículos de prueba por cada medio de cultivo =  
20 artículos de prueba

La cantidad de muestra a tomar de cada unidad corresponde a 200,0 mg de muestra (Tabla 4).

200,0 mg de muestra × 20 artículos de prueba = 4000,0 mg de muestra =  
4,0 g de muestra

#### **4.4 Preparación del Miristato de isopropilo**

Para obtener el Miristato de isopropilo estéril se filtró a través de una unidad de filtración estéril con un filtro estéril de 0.22 $\mu$  una vez filtrado se dispuso en alícuotas de 200,0 ml en frascos estériles de 500ml esto se realizó para el control y la muestra, posteriormente fue calentado 44°C y se mantuvo a esta temperatura en un baño de agua, esto con la finalidad que los ungüentos fueran solubilizados en dicho reactivo.

#### **4.5 Preparación de las muestras**

Se seleccionaron 20 ungüentos por corrida, los envases se sanitizaron exteriormente con el sanitizante en turno. Se colocaron las muestras del producto a analizar dentro de la campana de flujo laminar y se secaron con un paño estéril antes de abrirlas, asépticamente se tomaron 200,0 mg de cada unidad de los veinte artículos de prueba, la cantidad de muestra se pesó en la balanza Mettler Toledo, y se colocó dentro del recipiente que contenía los 200,0 mL de Miristato de isopropilo caliente. Todas las actividades se realizaron dentro de la campana de flujo laminar

#### **4.6 Preparación del inóculo**

Se tomaron 600 mL de la solución IV y se distribuyeron en 6 frascos lecheros estériles con tapa (100mL en cada frasco) y se inoculó el volumen correspondiente para cada microorganismo de acuerdo a la cuenta obtenida para *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spizizenii*, *Clostridium sporogenes* y *Aspergillus brasiliensis*.

#### **4.7 Control positivo**

Se adiciona el volumen correspondiente para cada microorganismo de acuerdo a la cuenta obtenida de cada suspensión en una porción de enjuague por separado, se filtra la solución de enjuague inoculada y se completa la prueba

como esta descrita en el método que está siendo validado pero sin filtrar la muestra de prueba.

#### 4.8 Procedimiento de prueba.

La Validación de la prueba de esterilidad fue realizada de acuerdo al procedimiento interno ME.M89.2MTP.04240.R07 "Prueba de esterilidad para ungüentos solubles en miristato de isopropilo". La preparación de la muestra se realizó pesando la cantidad de muestra indicada en la tabla la cual corresponde a 4,0 gramos totales de las 20 unidades de prueba, esta cantidad de ungüentos se adiciono a 200,0 ml de Miristato de isopropilo el cual se encontraba a una temperatura de 44°C y se continuó de acuerdo a procedimiento. Los estudios de validación fueron desarrollados en el laboratorio usando canastillas Steritest® de la marca Millipore Catalogo No. TTHAPC210 con membranas de filtración de 0.45µm. Se abrió el paquete y se introdujeron las cámaras de filtración en la base del porta canastillas, de acuerdo a como se observa en la Figura 4, se les colocaron los tapones rojos en los venteos de aire, se abrió el cabezal de la bomba, introduciendo la manguera y cerrando posteriormente el cabezal de la bomba peristáltica.

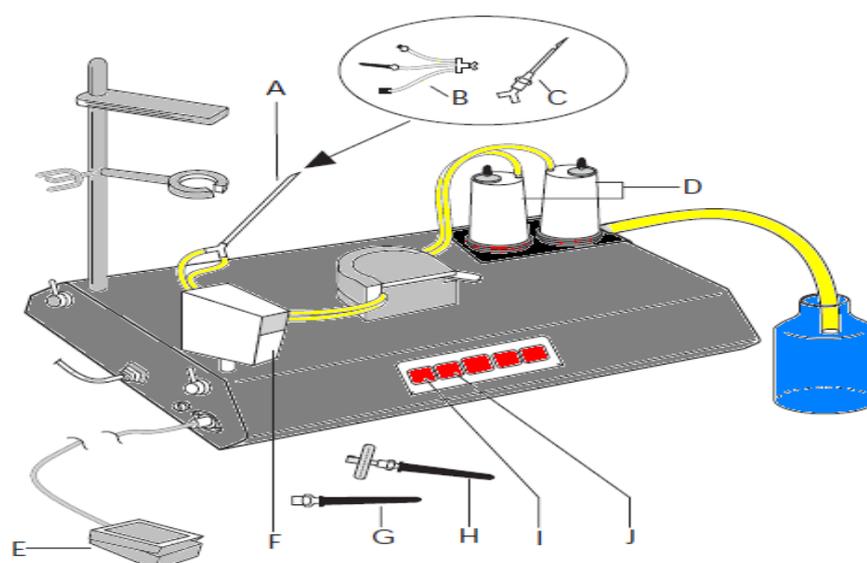
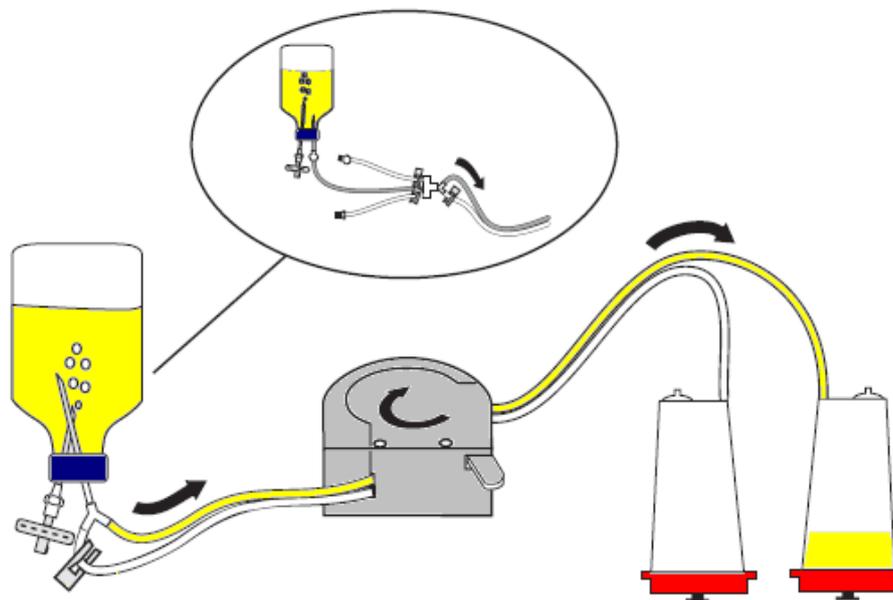


Figura 4. Equipo Steritest. A. Steritest adaptador de aguja, B. Steritest aguja adaptador, C. Steritest aguja adaptador, D. Canastillas Steritest, E. accesorio de control de pie, F - Ampolleta interruptor (Steritest para ampollitas y bolsas plegables), G. Aguja, H. Aguja con ventilación, I. Tecla de encendido J. START / STOP.

El contenido total de 20 muestras de la cantidad indicada en la tabla, se pasó a un contenedor con 200 ml de MIP, se quitó la tapa que cubre la aguja e introdujo dentro del frasco con el Pool, se llenaron las cámaras de filtración, entonces todo la solución fue filtrada a través de las canastillas mediante la acción de la bomba peristáltica. Se pasaron 2,200 mL de la solución IV de enjuague a través de las canastillas activando la bomba (Fig. 5). Los 200,0 mL restantes de la solución IV que son el complemento de los 2,400 ml de enjuague, se dividieron en dos porciones de 100 ml para inocular cada porción con uno de los microorganismos de prueba. Una de las mangueras fue obstruida con una de las pinzas aproximadamente a 1-2 cm de la aguja. Se procedió a filtrar la porción de 100 ml de la solución IV inoculada con menos de 100 UFC de uno de los 6 microorganismos de prueba.

**Figura 5. Filtración de la solución de enjuague y muestra de análisis, mediante la bomba de vacío.**

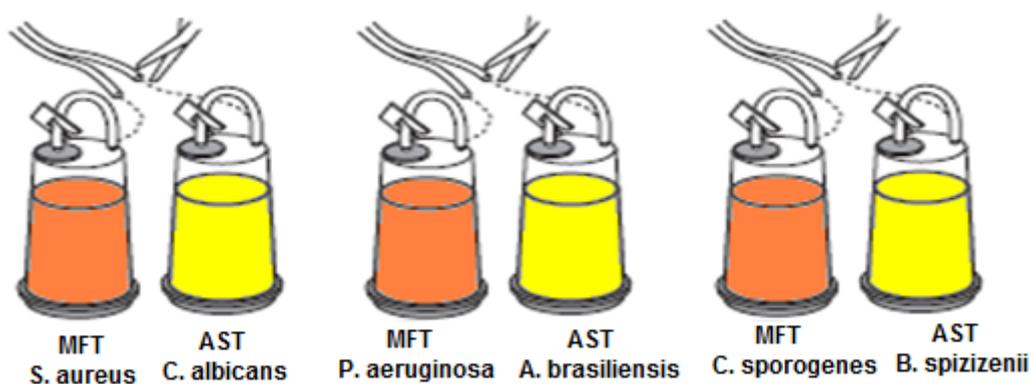


Se sacó la canastilla de filtración inoculada y se colocó el tapón amarillo en la parte inferior de la canastilla de filtración cerciorándose de que no tuviera puesto el tapón rojo, se quitó la tapa a la aguja e introdujo en el medio de cultivo de Caldo Soya Trypticaseina, se llenó la cámara de filtración con 100,0 mL y se colocó la pinza de obstrucción en dónde termina la manguera de plástico,

posteriormente se quitó la pinza de obstrucción colocada al principio de la manguera y se colocó en la otra manguera, y se procedió a filtrar la otra porción de 100,0 mL de la solución IV inoculada con menos de 100 UFC del microorganismo de prueba. Se sacó la cámara de filtración inoculada y se colocó el tapón amarillo en la parte inferior de la cámara de filtración cerciorándose de que no tuviera puestos el tapón rojo, se introdujo la aguja en el medio correspondiente al microorganismo inoculado y se llenó con 100,0 mL del medio Fluido de Tioglicolato.

Con tijeras estériles se cortaron las mangueras de la cámara de filtración pegada al cabezal de la bomba de filtración a una distancia aproximada de 7,0 cm de longitud de cada una de las mangueras, y se colocaron en la parte superior de la canastilla, permitiendo así cerrar el sistema de dichas canastillas, se retiraron de la bandeja de drenaje (Figura 6). Este proceso se repite hasta realizar la inoculación de los 6 microorganismos de prueba.

**Figura 6. Inoculación y corte de canastillas.**



#### 4.9 Confirmación del inóculo de prueba

Se toma el volumen correspondiente para cada microorganismo de acuerdo a la cuenta obtenida para *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, para *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes* y para *Aspergillus niger* y se coloca en la superficie de las placas con Agar Soya

Tripticaseína por duplicado. Inmediatamente después se procede a esterilizar el asa de siembra en el mechero, hasta el rojo vivo y se enfría antes de comenzar la distribución del inóculo en toda la superficie de la placa, se realiza este procedimiento para cada uno de los microorganismos de prueba, se incuban a 35°C por tres días para bacterias y a 20°C por un periodo de hasta cinco días. En el caso de *Clostridium sporogenes* este se incuba en condiciones de anaerobiosis. Después del periodo de incubación se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias para cada microorganismo se obtuvo el promedio de ambas placas y este promedio es el que se presenta en las tablas de resultados.

#### 4.10 Condiciones de incubación.

Las condiciones de incubación para las canastillas de acuerdo al microorganismo y medio de cultivo que contengan, son las indicadas en la tabla

Tabla 6. Condiciones de incubación para los microorganismos de prueba. <sup>(25)</sup>

Microorganismo de prueba	Medio de cultivo	Condiciones	Temperatura de incubación	Tiempo máximo de incubación
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Medio fluido de tioglicolato	Aerobiosis	30°C-35°C	3 días
<i>Staphylococcus aureus</i>		Aerobiosis	30°C-35°C	3 días
<i>Clostridium sporogenes</i>		Anaerobiosis	30°C-35°C	3 días
<i>Bacillus spizizenii</i>	Caldo soya tripticaseína	Aerobiosis	20°C-25°C	3 días
<i>Candida albicans</i>		Aerobiosis	20°C-25°C	5 días
<i>Aspergillus brasiliensis</i>		Aerobiosis	20°C-25°C	5 días

Si después de la incubación, el crecimiento que presenta el frasco contenedor del producto es similar al del control positivo (sin producto), se considera que el producto no posee propiedad antimicrobiana bajo las condiciones de prueba o bien, ha sido eliminada satisfactoriamente y la prueba de esterilidad del producto debe realizarse sin modificaciones posteriores.

Si después de la incubación no se obtiene crecimiento en presencia del producto, se considera que posee actividad que no ha sido eliminada bajo las condiciones de prueba, por lo que es necesario modificar las condiciones de prueba modificando los volúmenes de medio de cultivo, diluyente, concentración del agente inactivante, con la finalidad de eliminar dicha actividad y repetir la prueba de validación.

#### **4.11 Verificación del crecimiento.**

Aquellas canastillas en dónde se presentó crecimiento se realizó la verificación del mismo, se procedió a abrir las canastillas de la manguera que está colocada en ellas, se acerca cuidadosamente a la flama del mechero esa parte de la manguera y con unas pinzas se afloja la manguera y se separa del contenedor. Por el orificio que quedó, se extrae cuidadosamente una gota del medio de cultivo inclinando la canastilla sobre una placa de Agar Soya Tripticaseina. Posteriormente se vuelve a colocar la manguera sobre la canastilla. Con un asa estéril se procede a un aislamiento. Se incubaron las placas de AST 30-35 °C por un periodo de 2-4 días, en el caso de aquellas muestras que fueron inoculadas con *Clostridium sporogenes* se realiza el mismo procedimiento, realizándose la incubación en condiciones de anaerobiosis.

#### **4.12 Tinción de Gram**

Se realizó una tinción Gram de los microorganismos aislados en la verificación del crecimiento, con el fin de corroborar que tuvieran la morfología microscópica de la cepa originaria.

Se depositó sobre un portaobjetos limpio y desengrasado una gota de agua. Con el asa la cual es previamente esterilizada se toma una asada de la colonia aislada del microorganismo y se realiza una suspensión homogénea con la gota de agua, extendiéndola para formar una película delgada. Se aplicó calor suave al portaobjetos con la llama de un mechero de manera paulatina. El calor

no debe ser excesivo de tal manera que la colocar el portaobjetos sobre el torso de la mano sea tolerable el calor, ya que esto es únicamente con el fin de fijar la suspensión al portaobjetos. Se dejó enfriar y se cubrió el frotis con la solución de cristal violeta, la cual se dejó actuar 1 minuto, se realizó un lavado con agua y se cubrió el frotis con la solución yodo-yodurada como mordente y se dejó actuar 1 minuto, se realizó un lavado con agua y se Decolora el frotis gota a gota con la solución alcohol-acetona, durante no más de 15 segundos, se realizó un lavado con agua, finalmente se cubrió el frotis con la solución de safranina, la cual se deja actuar 1 minuto y se lava con agua, se inclina el portaobjetos para que escurra el exceso de agua y se secan los bordes con papel absorbente(Figura 7).

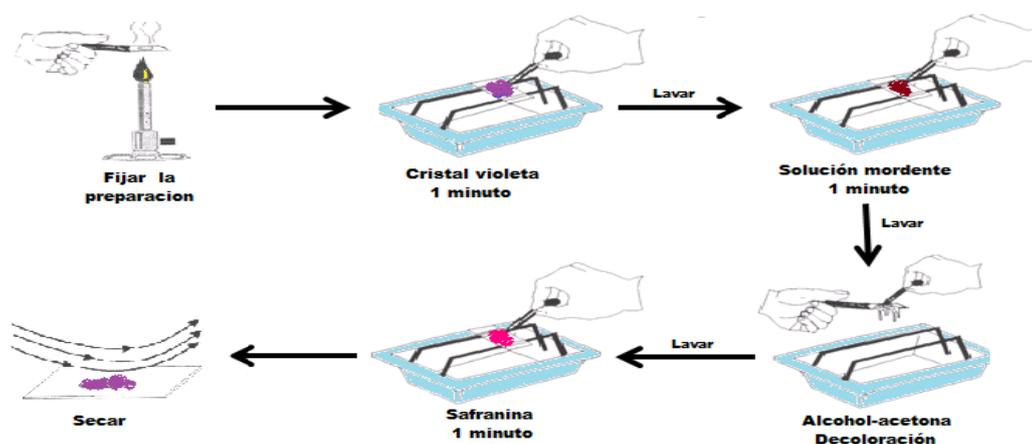


Figura 7. Tinción de Gram.

La tinción realizada se observó al microscopio donde se identificó la morfología de los microorganismos aislados.

Tinción de Gram	Microorganismo
Cocos Gram positivos	<i>Staphylococcus aureus</i>
Bacilos Gram negativos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bacilos Gram positivos	<i>Clostridium sporogenes.</i>
Bacilos Gram positivos	<i>Bacillus subtilis</i>
Levaduras Gram positivas	* <i>Candida albicans</i>

Tabla 7. Descripción de morfología para cada microorganismo de prueba.\*En el caso de *Candida albicans* se realiza la tinción de Gram sin embargo esta no es específica para levaduras pero nos permite observar su morfología, obteniendo levaduras Gram +.

La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

#### **4.13 Criterios de aceptación.**

El ensayo es considerado válido si se cumplen con las siguientes condiciones:

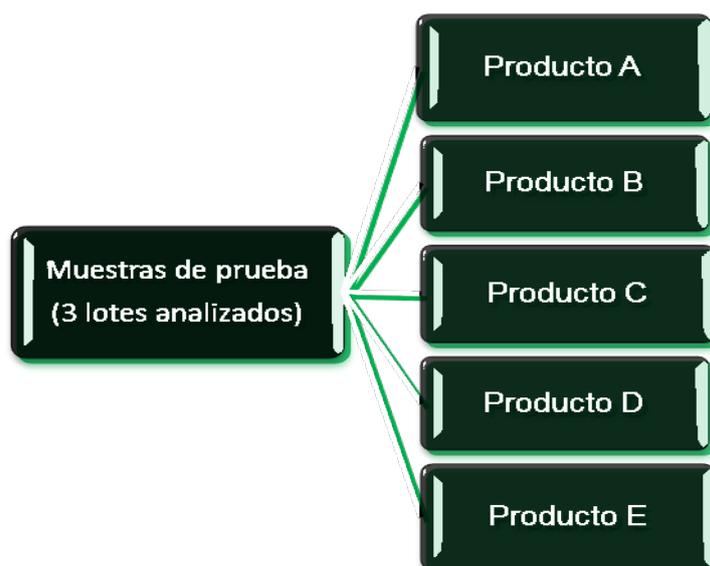
- Se cumplen las pruebas de promoción de crecimiento de los medios de cultivo.
- Si se cumple con la prueba de esterilidad de las soluciones y medios de cultivo, así como el pH.
- Si hay crecimiento del control positivo.
- El crecimiento en el producto analizado es visualmente comparable al control positivo.
- El microorganismo inoculado presenta las características microscópicas de la cepa de procedencia.
- Si existe pureza en cada una de las muestras analizadas.
- El promedio del inóculo de prueba no fue mayor a 100 UFC.
- Las condiciones anteriores cumplieron para las tres corridas diferentes de producto.
- Si el crecimiento fue observado dentro de los periodos establecidos en ambas farmacopeas para cada uno de los microorganismos de prueba.

## Capítulo 5. Resultados

La validación del método de análisis para la prueba de esterilidad se realizó para cinco ungüentos oftálmicos, en tres lotes por cada producto, cada lote fue inoculado con seis microorganismos de prueba y fueron revisados cada día, se consideró el día de inoculación como el día cero.

En las tablas se muestran los resultados de:

1. El promedio de la verificación del inóculo de prueba reportado como Unidades Formadoras de Colonias.
2. La verificación del crecimiento para la muestra analizada (M) y control (C) el cual se indica como positivo (+), si se obtuvo crecimiento de microorganismos o negativo (-) si no se obtiene crecimiento alguno.
3. Tiempo y condiciones de incubación para la muestra y el control en el momento de presentar el resultado.
4. Tinción de gram realizada para corroborar el crecimiento del microorganismo de prueba.



Producto A	Lote 1
Conservador: Metilparabeno y Propilparabeno	
Presentación: 3,5 gramos	
Solución de lavado: Solución IV FEUM	
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	47	M	- **	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	77	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	39	M	+	3
			C	+	3
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	80	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	38	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	52	M	+	4
			C	+	4

Tabla No.8 Resultados de los análisis del producto A correspondientes al lote 1, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba. \*\* Análisis de la muestra con *Pseudomonas aeruginosa* donde no se observó crecimiento de este microorganismo bajo las condiciones de prueba.

Microorganismo de prueba	Muestra/Control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	-
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 9. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) Microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto A	Lote 2
Conservador: Metilparabeno y Propilparabeno	
Presentación: 3,5 gramos	
Solución de lavado: Solución IV FEUM	
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	53	M	-**	2
			C	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	65	M	+	2
			C	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	37	M	+	2
			C	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	81	M	+	2
			C	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	36	M	+	5
			C	+	5
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	54	M	+	2
			C	+	2

Tabla 10. Resultados de los análisis del producto A correspondientes al lote 2, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba. \*\* Análisis de la muestra con *Pseudomonas aeruginosa* donde no se observó crecimiento de este microorganismo bajo las condiciones de prueba.

Microorganismo de prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	-
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 11. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto A	Lote 3
Conservador: Metilparabeno y Propilparabeno	
Presentación: 3,5 gramos	
Solución de lavado: Solución IV FEUM	
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	37	M	-**	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	66	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	54	M	+	3
			C	+	3
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	83	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	47	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	41	M	+	4
			C	+	4

Tabla 12. Resultados de los análisis del producto A correspondientes al lote 3, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inoculo de prueba. \*\* Análisis de la muestra con *Pseudomonas aeruginosa* donde no se observó crecimiento de este microorganismo bajo las condiciones de prueba.

Microorganismo de prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	-
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 13. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponde su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto A	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Conservador: Metilparabeno y Propilparabeno			
Presentación: 3,5 gramos			
Solución de lavado: Solución IV FEUM			
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL			

	Microorganismo	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento			Promedio tiempo de incubación (días)
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	
MFT 30-35 °C	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i> ATCC 9027	M	-	-	-	3
		C	+	+	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
CST 20-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	+	+	+	4
		C	+	+	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3

Tabla 14. Resultado de los tres lotes analizados para el producto A, en la cual se observa el crecimiento de los microorganismos de prueba. \*De los tres lotes analizados, en todos los casos en el análisis con *P.aeruginosa* el resultado fue negativo ya que no se observó el crecimiento de este microorganismo bajo las condiciones de prueba.

Producto B	Lote 1
Conservador: Clorobutanol	
Presentación: 3,5 gramos	
Solución de lavado: Solución IV FEUM	
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	47	M	- **	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	77	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	39	M	+	3
			C	+	3
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	80	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	38	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	52	M	+	4
			C	+	4

Tabla 15. Resultados de los análisis del producto B correspondientes al lote 1, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inoculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 16. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponde su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto B	Lote 2
Conservador: Clorobutanol Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	53	M	+	2
			C	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	65	M	+	2
			C	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	37	M	+	2
			C	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	81	M	+	2
			C	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	36	M	+	5
			C	+	5
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	54	M	+	2
			C	+	2

Tabla 17. Resultados de los análisis del producto B correspondientes al lote 2, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 18. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realizó tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto B	Lote 3
Conservador: Clorobutanol Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14	M	+	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	23	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	76	M	+	3
			C	+	3
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	76	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	40	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	61	M	+	4
			C	+	4

Tabla 19. Resultados de los análisis del producto B correspondientes al lote 3, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+

Tabla 20. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realizó tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto B	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Conservador: Clorobutanol Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL			

	Microorganismo	Muestra (M) Control (C)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio tiempo de incubación (días)
MFT 30-35 °C	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i> ATCC 9027	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
CST 20-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	+	+	+	4
		C	+	+	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3

Tabla 21. Resultado de los tres lotes analizados para el producto B, donde se observa el crecimiento de todos los microorganismos bajo las condiciones de prueba.

Producto C	Lote 1
Conservador: NA Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	47	M	+	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	77	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	76	M	+	3
			C	+	3
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	80	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	38	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39	M	+	3
			C	+	3

Tabla 22. Resultados de los análisis del producto C correspondientes al lote 1, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inoculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 23. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponde su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto C	Lote 2
Conservador: NA Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	53	M	+	2
			C	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	65	M	+	2
			C	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	37	M	+	2
			C	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	81	M	+	2
			C	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	36	M	+	5
			C	+	5
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	54	M	+	2
			C	+	2

Tabla 24. Resultados de los análisis del producto C correspondientes al lote 2, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inoculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 25. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponde su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto C	Lote 3
Conservador: NA Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14	M	+	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	23	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	37	M	+	2
			C	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	76	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	40	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	61	M	+	4
			C	+	4

Tabla 26. Resultados de los análisis del producto C correspondientes al lote 3, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+

Tabla 27. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realizó tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto C	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Conservador: NA Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL			

Microorganismo		Muestra (M) Control (C)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio tiempo de incubación (días)
MFT 30-35 °C	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i> ATCC 9027	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
CST 20-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	+	+	+	4
		C	+	+	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3

Tabla 28. Resultado de los tres lotes analizados para el producto C, donde se observa el crecimiento de todos los microorganismos bajo las condiciones de prueba.

Producto D	Lote 1
Conservador: NA Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	43	M	+	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	58	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	56	M	+	3
			C	+	3
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	79	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	31	M	+	3
			C	+	3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	60	M	+	3
			C	+	3

Tabla 29. Resultados de los análisis del producto D correspondientes al lote 1, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba.

Microorganismo de prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 30. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realizó tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto D	Lote 2
Conservador: NA	
Presentación: 3,5 gramos	
Solución de lavado: Solución IV FEUM	
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	73	M	+	2
			C	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	72	M	+	2
			C	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	37	M	+	2
			C	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	81	M	+	2
			C	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	31	M	+	3
			C	+	3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	46	M	+	3
			C	+	3

Tabla 31. Resultados de los análisis del producto D correspondientes al lote 2, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 32. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realizó tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto D	Lote 3
Conservador: NA Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14	M	+	2
			C	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	47	M	+	2
			C	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	74	M	+	2
			M	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	84	M	+	2
			C	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	47	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39	M	+	3
			C	+	3

Tabla 33. Resultados de los análisis del producto D correspondientes al lote 3, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inoculo de prueba.

Microorganismo de prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 34. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponde su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto D	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Conservador: NA Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL			

	Microorganismo	Muestra (M) Control (C)	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio tiempo de incubación (días)
MFT 30-35 °C	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i> ATCC 9027	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
CST 20-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2

Tabla 35. Resultado de los tres lotes analizados para el producto D, donde se observa el crecimiento de todos los microorganismos bajo las condiciones de prueba.

Producto E	Lote 1
Conservador: Clorobutanol	
Presentación: 3,5 gramos	
Solución de lavado: Solución IV FEUM	
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	43	M	+	3
			C	+	3
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	58	M	+	3
			C	+	3
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	56	M	+	3
			C	+	3
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	79	M	+	3
			C	+	3
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	31	M	+	3
			C	+	3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	60	M	+	3
			C	+	3

Tabla 36. Resultados de los análisis del producto E correspondientes al lote 1, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 37. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realizó tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto E	Lote 2
Conservador: Clorobutanol Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	73	M	+	2
			C	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	72	M	+	2
			C	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	37	M	+	2
			C	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	81	M	+	2
			C	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	31	M	+	3
			C	+	3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	46	M	+	3
			C	+	3

Tabla 38. Resultados de los análisis del producto E correspondientes al lote 2, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inóculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 39. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponden a su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realizó tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto E	Lote 3
Conservador: Clorobutanol Presentación: 3,5 gramos Solución de lavado: Solución IV FEUM Volumen de solución de lavado: 2 500 mL	

Condiciones de incubación	Microorganismo de prueba	UFC*	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento	Tiempo de incubación (días)
MFT 30°C-35°C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14	M	+	2
			C	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	47	M	+	2
			C	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	74	M	+	2
			C	+	2
CST 20°C-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	84	M	+	2
			C	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	47	M	+	4
			C	+	4
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	39	M	+	3
			C	+	3

Tabla 40. Resultados de los análisis del producto E correspondientes al lote 3, en el cual se observó el crecimiento de todos los microorganismos de prueba.\* Resultado del promedio de la verificación del inoculo de prueba.

Microorganismo de Prueba	Muestra/control	Verificación de crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	M	+
	C	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+
	C	+
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+
	C	+
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+
	C	+
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	NA
	C	NA
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+
	C	+

Tabla 41. Verificación de crecimiento mediante tinción de Gram realizada a los microorganismos de prueba, una vez finalizado el tiempo de incubación. (+) Microorganismos que corresponde su morfología al realizar la tinción de Gram, (-) microorganismos que al observar los resultados no se observó crecimiento por tanto no se realiza tinción de Gram, (NA) La verificación de *A. brasiliensis* se aceptó con la confirmación visual directa dentro de la canastilla, por su formación característica de micelio circular en el medio líquido.

Producto E	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Conservador: Clorobutanol			
Presentación: 3,5 gramos			
Solución de lavado: Solución IV FEUM			
Volumen de solución de lavado: 2 500 mL			

	Microorganismo	Muestra (M) Control (C)	Crecimiento			Promedio tiempo de incubación (días)
			Lote 1	Lote 2	Lote 3	
MFT 30-35 °C	<i>Pseudomonas aeruginosa*</i> ATCC 9027	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2
	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2
CST 20-25°C	<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	M	+	+	+	2
		C	+	+	+	2
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	M	+	+	+	3
		C	+	+	+	3

Tabla 42. Resultado de los tres lotes analizados para el producto E, donde se observa el crecimiento de todos los microorganismos bajo las condiciones de prueba.

## Capítulo 6. Análisis de resultados

Este trabajo se llevó a cabo siguiendo los procedimientos analíticos desarrollados en Alcon México y fue realizado para verificar que la metodología que se emplea para realizar la prueba de esterilidad es la adecuada.

La prueba se realizó mediante el procedimiento interno ME.M89.2MTP.04240.R07, sin embargo para obtener una mejor recuperación de los microorganismos de prueba se hicieron algunas modificaciones a este procedimiento tales como volúmenes y tipos de soluciones neutralizantes, obteniendo mejores resultados bajo la Metodología antes mencionada.

Se validó el método de análisis usado para realizar la prueba de esterilidad de 5 ungüentos oftálmicos mediante el método de filtración de membrana, evaluando 6 microorganismos de prueba: *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *C.sporogenes*, *B.spizizenii*, *C.albicans* y *A.brasiliensis*. De acuerdo a los resultados obtenidos la mayor recuperación de microorganismos se obtuvo utilizando un enjuague con 2500,0 mL de la solución IV.

Es importante mencionar la neutralización del agente antimicrobiano presente en cada muestra ya que de acuerdo a la FEUM para neutralizar un agente antimicrobiano se puede utilizar; inhibición química basada en el uso de un neutralizante específico (solución IV), dilución (volumen de enjuague) o filtración por membrana. Para realizar esta validación se decidió emplear los tres métodos propuestos. La solución IV de acuerdo a la FEUM la cual contiene peptona, extracto de carne y polisorbato 80, en el caso de los ungüentos que contenían como agente antimicrobiano metilparabeno y propilparabeno se realizó inhibición química mediante el polisorbato 80 contenido en la solución, para los ungüentos que contenían clorobutanol como agente antimicrobiano de acuerdo a la FEUM se recomienda la dilución y la filtración por membrana se realizó en todos los casos. De esta manera se buscó mediante la combinación de estos métodos la mejor neutralización del agente antimicrobiano.

En el caso del producto A, de acuerdo a los resultados obtenidos la mayor recuperación de microorganismos se obtuvo utilizando 2500,0 mL de la solución IV, logrando de esta manera recuperar 5 de los 6 microorganismos inoculados, sin embargo el único microorganismo no recuperado es *P.aeruginosa* por lo cual se plantea la hipótesis que pudiera ser inhibido por la presencia del principio activo presente en esta que es la Polimixina B la cual de acuerdo a estudios realizados presenta un amplio espectro contra este microorganismo.

En el caso de los ungüentos B, C, D y E se obtuvo la recuperación de los seis microorganismos de prueba bajo las condiciones establecidas para cada uno de ellos, y se logró corroborar la funcionalidad del método de análisis para la realización de la prueba de esterilidad.

El producto A bajo las condiciones establecidas no se logra la recuperación de todos los microorganismos de prueba, se pueden seguir probando volúmenes mayores y otras soluciones neutralizantes, por lo cual este producto continúa en proceso de validación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la validación del método de análisis para los productos B, C, D y E se puede observar que el método de análisis propuesto nos permite detectar cualquiera de los microorganismo de prueba utilizados que pudiera estar presente en el producto, por tanto el método propuesto para estos ungüentos se considera validado.

.

## Capítulo 7. Conclusiones

- Mediante la evidencia documentada obtenida se demuestra que la metodología realizada de manera rutinaria en el laboratorio de control microbiológico para el análisis de la prueba de esterilidad, es capaz de detectar una baja concentración de microorganismos que pudieran estar presentes en los productos probados en este trabajo.
- Se considera validado el método de análisis para realizar la prueba de esterilidad por el método de filtración en membrana para los ungüentos B, C, D y E ya que cumplieron con los requerimientos de USP y FEUM, y al realizarse al menos tres determinaciones independientes del experimento cada una demostró un crecimiento en el análisis de la muestra comparable con el control.
- La metodología se considera validada para los productos probados mientras no se cambien los parámetros de prueba, cualquier cambio deberá requerir un análisis y evaluación que demuestre la continuidad de la validación.
- La validación del método para la estimación de la población de microorganismos en un producto realizado mediante filtración de membrana, nos permitió determinar la eficiencia en la recuperación de los microorganismos de prueba.
- En el caso del producto A se recomienda continuar con el proceso de validación, ya que no se recuperó *P. aeruginosa*.

## Capítulo 8. Bibliografía

1. Alpizar R., Baltazar H., Formas Farmacéuticas Solidas, Segunda edición 2009, Editorial Fac. de Química UNAM, ISBN 978-607-02-0814-0.
2. Edwards C. Validation of solid dosage forms, the FDA view. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1989; 15 (6&7): 1119- 1133.
3. Totzlaff RF, Sheperd. RE, Loblanc AJ. The validation story: perspectives on the systematic GMP inspection approach and validation development. *Pharmaceutical Technology* 1993; (march): 100-116.
4. García Montoya Encarnación Optimización, validación y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos. Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia Tesis doctoral Facultad de Farmacia Universidad de Barcelona, Barcelona. Data de lectura: 05 /06/01
5. Romaní R. M. Validación del análisis cuantitativo de Simefina por el método de espectrometría de absorción Infrarroja por transformada de Fourier (Trabajo de Aptitud Profesional para optar el Título de Química Farmacéutico). Lima: Universidad Nacional de San Marcos; 1996.
6. Flores Jaime Juliane. Validación concurrente del proceso de fabricación de tabletas recubiertas de amoxicilina 500mg (Trabajo de Aptitud Profesional para optar el Título de Química Farmacéutico). Lima: Universidad Nacional de San Marcos; 2002.
7. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second Report. Geneva, World Health Organization, 1992. (WHO Technical Report Series, No 823). Annex 1.
8. Acquier R. De la maîtrise à l'anticipation. *STP Pharma Pratiques* 1997; 7 (5): 327-331.
9. Salazar R. Normas de Correcta Fabricación de medicamentos y normas de Buenas Prácticas de Laboratorios. En: Faulí C. Tratado de Farmacia Galénica. Madrid: Ed Luzán; 1993. p. 105-113.
10. Chapman K. Worldwide opportunities though validation. *STP Pharma Pratiques* 1992; 2 (5): 415-422.
11. Norma Oficial Mexicana. NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos (modifica a la NOM-059-SSA1-1993, publicada el 31 de julio de 1998).

12. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Generalidades.
13. Norma Oficial Mexicana NOM-001-SSA1-93, Que instituye el procedimiento por el cual se revisará, actualizará y editará la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
14. González Claudio, Validación Retrospectiva y Control Estadístico de Procesos en la Industria farmacéutica. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, 2005.
15. Fairbrother J. Acetaminophen. *Analytical Profiles of Drug Substances* 1974; 3: 40-72.
16. Humeida A El Obeid, Abdullah A Al Badr. Acetaminophen. *Analytical Profiles of Drug Substances* 1985; 14: 567-585.
17. CIPAM, Buenas Practicas de Validación, Monografía técnica No.24, 1°Ed., México, 2006.
18. United States Pharmacopeia 34
19. Control Microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos: [http://www.ucv.ve/fileadmin/user\\_upload/facultad\\_farmacia/catedraMicro/10\\_Control\\_Microbiol%C3%B3gico\\_PNE.pdf](http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Control_Microbiol%C3%B3gico_PNE.pdf)
20. USP 34, Edición Español, Formas Farmacéuticas, 770-771
21. USP 34, Edición Español, Validación de Procedimientos Farmacopeicos 857-860
22. USP 34, Edición Español, Procedimientos Farmacopeicos/información general 862-864
23. USP 34, Edición Español, Prueba de Esterilidad, 770-771
24. FEUM 10Ed.formas farmacéuticas
25. FEUM 10Ed.Prueba de esterilidad
26. Remington, Farmacia, Medica Panamericana, 19° Ed, Buenos Aires,(1998), 953-963.
27. Revista Cubana Oftalmología 1996; 9(1), Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto", Farmacología en enfermedades oftálmicas (II). Antimicrobianos *Dr. Alfredo J. Céspedes Valcárcel*
28. MILLIPORE: <http://www.millipore.com/?lang=es>
29. Feigenbaum, Total Quality Control, Mc Graw Hill, 3° Ed, Mexico 1994, 119-153