

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades



**Implementación y validación de métodos de análisis  
microbiológico en una industria farmacéutica para la  
cuantificación de cianocobalamina y ácido fólico en cápsulas**

Trabajo de investigación presentado por  
**Andrea Cárcamo Roma**  
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2007



**Implementación y validación de métodos de análisis  
microbiológico en una industria farmacéutica para la  
cuantificación de cianocobalamina y ácido fólico en cápsulas**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA  
Facultad de Ciencias y Humanidades

**Implementación y validación de métodos de análisis  
microbiológico en una industria farmacéutica para la  
cuantificación de cianocobalamina y ácido fólico en cápsulas**

Trabajo de investigación presentado por  
**Andrea Cárcamo Roma**  
para optar al grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2007

Vo. Bo. :

(f)

---

Licenciada Sandra Barrios  
Jefe de Producción de Líquidos y Sólidos  
Unipharm, S.A.  
Asesora

Tribunal Examinador:

(f)

---

Licenciada Sandra Barrios  
Jefe de Producción de Líquidos y Sólidos  
Unipharm, S.A.  
Asesora

(f)

---

Licenciado Walter López  
Jefe de Control de Calidad  
Unipharm, S.A.

(f)

---

Dra. Pamela Pennington  
Directora de Departamento de Bioquímica y Microbiología  
Universidad del Valle de Guatemala

Fecha de aprobación: Guatemala, abril 12 de 2007

Deseo agradecer y dedicar este trabajo de investigación,

- ◆ A **Dios**, por todas las bendiciones que me ha concedido; por ser la fuente de energía, fuerza y amor en mi vida.
- ◆ A mi familia, en especial a mis padres y hermano, **Mario, Nora y Rodrigo**, por el gran esfuerzo que hicieron a lo largo de estos años. Gracias por la paciencia, el apoyo y el amor que me dan día a día. No lo hubiera logrado sin ustedes.
- ◆ A mis **compañeros de clase y amigos de toda la vida**, por su valiosa amistad, apoyo y ayuda a lo largo de estos años. Eternamente agradecida.
- ◆ Al personal de control de calidad de Unipharm S.A., en especial a **Doña Lili y Juan Carlos**, por ayudarme y apoyarme en la realización de este trabajo. Por su paciencia y disposición, por su cariño, consejos y preocupación, por hacer más fácil el recorrido.
- ◆ A mi asesora, **Licenciada Sandra Barrios**, por guiarme, ayudarme y aconsejarme durante la elaboración de este trabajo de investigación.
- ◆ Al **Licenciado Walter López**, por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de graduación en tan prestigiosa empresa, por darme la oportunidad de trabajar con ustedes y ser parte del grupo Unipharm. ¡Gracias!

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS .....	ix
LISTA DE GRÁFICAS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
RESUMEN .....	xii
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes .....	3
A. Cianocobalamina .....	3
1. Propiedades de la Cianocobalamina .....	4
2. Métodos para cuantificación de cianocobalamina en formas farmacéuticas sólidas .....	5
B. Ácido fólico .....	8
1. Propiedades del ácido fólico .....	9
2. Métodos para cuantificación de ácido fólico en formas farmacéuticas sólidas .....	10
C. Importancia de la combinación de ácido fólico y cianocobalamina en formas farmacéuticas sólidas .....	15
D. Procedimiento para implementación de metodología de cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina por medio de análisis microbiológico ..	15
E. Validación de los métodos de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico y cianocobalamina a implementar .....	18
F. Validación de equipo utilizado en análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico y cianocobalamina .....	22
III. Justificación .....	25
IV. Objetivos .....	27
V. Hipótesis .....	28
VI. Diseño experimental .....	29
VII. Resultados y discusión .....	41
VIII. Conclusiones .....	56

IX.	Recomendaciones.....	58
X.	Literatura citada.....	59
XI.	Apéndice.....	62
	A. Ciclo de la metionina-homocisteína-ácido fólico-vitamina B <sub>12</sub> .....	62
	B. Preparación de soluciones de trabajo para cuantificación de ácido fólico usando método turbidimétrico.....	63
	C. Composición y preparación de medios de cultivo utilizados para la cuantificación de ácido fólico usando método turbidimétrico.....	65
	D. Composición y preparación de medios de cultivo utilizados para la cuantificación de cianocobalamina usando método turbidimétrico.....	67
	E. Reactivos químicos, materiales y equipo utilizados para cuantificación de ácido fólico en cápsulas.....	69
	F. Reactivos químicos, materiales y equipo utilizados para cuantificación de cianocobalamina en cápsulas.....	70

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Organismos control utilizados en ensayos microbiológicos para la cuantificación de vitamina B <sub>12</sub> . . . . .	7
2. Actividad de algunos organismos sobre el ácido fólico . . . . .	15
3. Requerimientos necesarios de validación para cada categoría . . . . .	20
4. Preparación de tubos para lectura de análisis microbiológico para cuantificar ácido fólico en cápsulas. . . . .	31
5. Preparación de soluciones patrón. . . . .	34
6. Preparación de soluciones patrón para cuantificación de cianocobalamina. . . . .	35
7. Preparación de soluciones de muestra para cuantificar cianocobalamina. . . . .	35
8. Ensayo para determinar la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificación de ácido fólico y cianocobalamina con 6 muestras de pulverizado de cápsula, de lotes distintos. . . . .	37
9. Requisitos con los que debe cumplir el coeficiente de variación total. . . . .	38
10. Determinación de la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina en cápsulas. . . . .	47
11. Determinación de la precisión intermedia del método de análisis microbiológico para cuantificación de ácido fólico en cápsulas. . . . .	48
12. Determinación de la repetibilidad del método de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina en cápsulas. . . . .	49
13. Determinación de la repetibilidad del método de análisis microbiológico para cuantificación de ácido fólico en cápsulas. . . . .	49
14. Determinación de la exactitud de los métodos de análisis microbiológico para cuantificación de cianocobalamina y ácido fólico en cápsulas. . . . .	50
15. Variación de la concentración de la solución patrón de ácido fólico al ser refrigerada. . . . .	52
16. Materiales y reactivos necesarios para la cuantificación de ácido fólico . . . . .	69
17. Materiales y reactivos necesarios para la cuantificación de cianocobalamina . . . . .	70

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica	Página
1. Linealidad y rango del sistema de cuantificación de cianocobalamina en cápsulas. ....	53
2. Linealidad del sistema de cuantificación de cianocobalamina en cápsulas. ....	53
3. Linealidad del sistema de cuantificación de ácido fólico en cápsulas . . . . .	54
4. Linealidad del sistema para cuantificación de ácido fólico en cápsulas . . . . .	55

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Componentes del ácido fólico . . . . .	13
2. Síntesis normal del ácido fólico . . . . .	13
3. Diagrama de flujo que explica el proceso de validación . . . . .	19
4. <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 8043 sembrado en agar sangre de carnero al 5%. Vista macroscópica. . . . .	44
5. (a) Tinción Gram de <i>Enterococcus hirae</i> ; (b) tinción Gram de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> . . . . .	45
6. Diagrama de flujo que muestra el ciclo de la metionina-homocisteína-ácido fólico-vitamina B12. . . . .	62

## RESUMEN

Se implementaron y validaron métodos de análisis microbiológico para la cuantificación de cianocobalamina y ácido fólico en cápsulas. Ambas metodologías se implementaron en un laboratorio farmacéutico.

El método de análisis microbiológico para la cuantificación de ácido fólico en cápsulas se lleva a cabo con la cepa bacteriana *Enterococcus hirae* ATCC 8043, mientras que la cuantificación de cianocobalamina se realiza con la bacteria *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 7830. Ambas cepas fueron monitoreadas para verificar su pureza, la cual se confirmó al observar las características morfológicas de las colonias formadas por cada una, así como por medio de la realización de tinciones de Gram. Se confirmó que *E. hirae* son cocos Gram positivo, dispuestos en cadenas cortas. No se logró determinar si *L. delbrueckii* es Gram positivo o Gram negativo, ya que la coloración obtenida en la tinción no coincide con lo reportado en la literatura.

Se estableció por medio de un barrido espectrofotométrico, que 550 nm es la longitud de onda más apropiada para realizar las lecturas de %T para cuantificar ácido fólico. Para la cuantificación de cianocobalamina se encontró que la longitud de onda que da mejores resultados es 530 nm.

Se descubrió que para el análisis de cianocobalamina, no es necesaria la extracción de ésta a partir de la muestra. Por el contrario, al querer cuantificar ácido fólico en cápsulas, éstas deben ser tratadas con una solución básica en combinación con aumento de temperatura y presión.

Fue necesario evaluar 6 parámetros analíticos establecidos por la USP que permitieron la validación de cada uno de los métodos a implementar. Todos los parámetros cumplieron con los criterios de aceptación que cada uno de ellos tiene como base para la validación del método, por lo tanto, se puede decir que los métodos a implementar poseen precisión intermedia, repetibilidad, exactitud, especificidad/selectividad, rango de trabajo adecuado para cada vitamina y linealidad en los sistemas de análisis. Tener todos los parámetros aceptados, se puede decir que los procesos de análisis están validados.

Se comprobó que ambos métodos son específicos para cada vitamina analizada; sin embargo, el método de la cianocobalamina no es 100% selectivo para ésta.

Al evaluar la estabilidad de la solución madre de ácido fólico, se encontró que ésta se degrada rápidamente si no se le agrega una capa de tolueno, pero también se observó que las muestras preparadas para la cuantificación tanto de cianocobalamina como ácido fólico fueron estables después de un día de elaboración, lo cual se comprobó mediante los resultados obtenidos.

Tanto para cianocobalamina como para ácido fólico, se analizaron 6 muestras de cápsulas, cada una de las cuales estaba compuesta por 20 cápsulas aproximadamente. Por medio de la ejecución de cada método, se determinó que la muestra 1 fue la que presentó menor concentración de cianocobalamina (7.298  $\mu\text{g}/\text{cápsula}$ ; 91.225% recuperación), mientras que en la muestra 5 fue donde se evidenció la concentración más baja de ácido fólico (0.797  $\text{mg}/\text{cápsula}$ ; 99.625% recuperación).

Se logró establecer el rango de trabajo para la cianocobalamina, siendo éste de 0.1316-10.2923  $\text{ng}/\text{mL}$ , mientras que el rango de trabajo calculado para el análisis de ácido fólico fue de 0.0110 a 0.04050  $\text{ng}/\text{mL}$ .

Al observar las curvas estándar de calibración obtenidas para cada vitamina, se determinó que ambos sistemas poseen buena linealidad. Esto lo confirman los valores obtenidos de  $R^2$  para cada curva: 0.9910 para ácido fólico y 0.9925 para cianocobalamina.

Con base a los resultados obtenidos en cada análisis, se puede decir que se logró implementar y validar ambos métodos de análisis microbiológico, uno destinado a la cuantificación de cianocobalamina y el otro, a la cuantificación de ácido fólico en cápsulas multivitamínicas elaboradas en una industria farmacéutica.