

Irradiación de pancreatina para aplicaciones médico-farmacéuticas

Emma Castro¹ ecastro@ipen.gob.pe, Marco Linares² mlinares@ipen.gob.pe, Kety León¹ ketyleon@yahoo.com

¹ Laboratorio de Irradiación de Productos Médicos, Departamento de Biología, Dirección General de Promoción y Desarrollo Tecnológico

² Laboratorio de Irradiación, Dirección de Aplicaciones, Dirección General de Seguridad Radiológica
Instituto Peruano de Energía Nuclear. Av. Canadá 1470, San Borja, Lima, Perú

Resumen

La pancreatina, sustancia conformada por la mezcla de enzimas digestivas, con aplicaciones en el campo médico-farmacéutico, por su origen y método de producción requiere ser sometida a un proceso de descontaminación. Así, muestras de pancreatina en polvo fueron empacadas en bolsas de polietileno de baja densidad y tratadas con radiación gamma a las dosis de 2, 3, 5, 6, 7, 8, 13 y 25 kGy. Se realizaron las pruebas microbiológicas y físico-químicas, indicadas en la US Pharmacopea, a las muestras irradiadas y control, para determinar la dosis óptima de descontaminación que permitiría el uso comercial del producto. Se determinó que las dosis mínima de 5 kGy era adecuada para descontaminar el producto ya que se lograba disminuir 3 ciclos logarítmicos de la carga inicial de microorganismos aerobios mesófilos en la muestra control, que incluía bacilos esporulados. De igual modo, a esta dosis, el porcentaje de humedad, la actividad enzimática, el olor y color del producto no sufrieron cambios significativos con respecto al control.

Abstract

Pancreatin is an enzyme mix conformed substance used in medical and pharmaceutical applications principally. Due to its origin and processing method, pancreatin possibly requires to undergo a decontamination process. Thus, sample of powered pancreatin were packed in polyethylene bags and gamma irradiated at 2, 3, 5, 6, 7, 8, 13 and 25 kGy. Microbiological and physico-chemical tests specified in the US Pharmacopea were performed to the irradiated samples and control in order to determine the optimum decontamination dose which will permit the commercial use of the product. It was determined that 5 kGy as minimum dose was adequate to reduce in 3 log cycles the initial bioburden of the product, which was composed principally by aerobic mesophiles, specifically sporulated bacilli. Moreover, results of assays involved loss of drying, enzymatic activity, colour and odour performed in irradiated samples showed no significant alterations respecting the control.

1. Introducción

La pancreatina es una sustancia conformada por la mezcla de las enzimas, amilasa, lipasa y proteasa. Se obtiene del páncreas del cerdo, *Sus scrofa* Linné var. *domesticus* Gray (Fam. Suidae) o del buey, *Bos taurus* Linné (Fam. Bovidae) [1]. A granel, es un polvo amorfo de color amarillo-crema, parcialmente soluble en agua e insoluble en alcohol.

Su aplicación en el campo farmacéutico y médico se basa principalmente en la propiedad de las enzimas, que conforman el

producto, para digerir los alimentos. Se utiliza para tratar trastornos digestivos caracterizados por flatulencia gastrointestinal, dispepsia, cuadros de diarreas persistentes [2], fibrosis cística o inflamación crónica o en caso de extirpación del páncreas entre otras. Por otro lado, la pancreatina se utiliza también como terapia complementaria de enzimas en el tratamiento de diversos tipos de cáncer [3].

Por su origen y método de producción, previo uso en el campo médico, en algunas ocasiones, la pancreatina requiere ser

sometida a un método de descontaminación. La radiación gamma, proveniente del Cobalto-60 es un método eficaz para controlar el crecimiento microbiano. Una de sus ventajas frente a otros métodos es su capacidad de penetrar incluso a las células contaminantes menos accesibles. Igualmente, el aumento de la temperatura durante el procesamiento es insignificante, por lo que es posible tratar productos sensibles al calor, como son las enzimas. En nuestro país este método se aplica, a nivel comercial, para la descontaminación y esterilización de productos de uso médico, fármacos, cosméticos así como tejidos y derivados biológicos.

Trabajos previos sobre la irradiación de enzimas indican que dosis esterilizantes de radiación, equivalentes a 25 kGy pueden afectar la capacidad enzimática del producto, sin embargo la aplicación de dosis descontaminantes puede permitir la irradiación del producto con fines comerciales, si se tiene en cuenta el número y tipo de microorganismos presentes y las condiciones en que se lleva a cabo el proceso de radiación.[4,5,6].

Así, la radiación se convierte en una alternativa para garantizar la calidad microbiológica del producto, sin embargo este método no es un sustituto de la Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) que se aplican durante la producción del producto.

El propósito de este trabajo es establecer los parámetros de irradiación para tratar comercialmente el producto pancreatina en polvo, mediante radiación gamma para su descontaminación. La US Pharmacopea[1], indica las especificaciones del polvo de Pancreatina para ser usado en formulaciones de uso farmacéutico. La pancreatina en polvo, luego de irradiada, a la dosis de descontaminación encontrada como óptima, debe mantener las especificaciones establecidas.

2. Metodología

Se irradió a diferentes dosis, muestras de pancreatina en polvo empacadas doblemente en polietileno de alta densidad, y se realizaron las pruebas estipuladas por la norma, en las muestras irradiadas y en el control no irradiado, de modo que se determine la dosis a la cual el producto se descontamina y no se alteran sus propiedades físico-químicas. A continuación se detallan las pruebas realizadas.

2.1 Dosimetría e irradiación de las muestras

La dosimetría permite determinar los tiempos de irradiación de las diferentes dosis y medir las dosis absorbidas por las muestras del producto. Los sistemas dosimétricos empleados fueron Fricke, de acuerdo a la Norma ASTM E1026-04 [9], como dosímetro de referencia y Etanol Clorobenceno como dosímetro de rutina, según la Norma ISO/ASTM 51538:2002 (E) [10]. Se realizó la dosimetría Fricke en aire y en producto, con una muestra de 2000g, con una densidad aparente en la cámara de irradiación de 0,566 g/cc.

Las irradiaciones se llevaron a cabo en el equipo de irradiación, modelo Gammacell 220 Excel, de la Nordion Inc. de Canada. Este equipo posee una fuente de Cobalto-60 con una actividad actual de 16 600 Ci al mes de mayo del 2006. Las dosis aplicadas fueron de 2, 3, 5, 6, 7, 8, 13 y 25 kGy.

Las lecturas de la absorbancia de los dosímetros Fricke irradiados, se realizaron a una longitud de onda λ de 303.00 nm, en el Espectrofotómetro Perkin Elmer, UV VIS, Lambda 2. A modo de control, durante la irradiación se colocaron con la muestra dosímetros de etanol clorobenceno cuya conductividad luego de irradiados se midió en el Oscilótitrador/TRIEM.

2.2 Límite microbiano

Este ensayo incluye las pruebas de Recuento Total de Aerobios Mesófilos; Recuento Total de Hongos, Detección de Patógenos: *Staphylococcus aureus*/10 g, *Escherichia coli*/10g y *Pseudomonas aeruginosa*/10 g. Los equipos que se utilizaron fueron: Autoclave Raypa AES-75 Dry, Estufa Incubadora VWR Scientific, Balanza toploading Mettler 682B, Agitador magnético Stuart Scientific, Baño maría Tecam, Shaker Orbital Labline, Agitador de tubos Fisher y Flujo Laminar Envair. Los medios de cultivo que se utilizaron fueron: Caldo Casoy, Agar Casoy, Agar Sabouraud Dextrosa 4%.

Las pruebas de detección de patógenos fueron realizadas por la empresa fabricante del producto. Los ensayos se realizaron según la US Pharmacopea[1].

Para conocer el tipo de microorganismos presentes en las muestras control e irradiadas, en las que se observó crecimiento, se llevaron a cabo tinciones Gram. De igual modo, en las mismas muestras se realizaron coloraciones de esporas según el método de Wirtz.

2.3 Pérdida por secado

Los equipos utilizados fueron: Estufa de Secado Fisher Isotemp, Vaccum Oven, Modelo 281 y la Balanza Analítica Fisher XA y desecador de vidrio.

Se realizó esta prueba a todas las muestras, irradiadas y control. La temperatura en la estufa de secado fue de 60°C y las muestras se secaron a un vacío de 25 psi. Las pruebas, que se realizaron por duplicado, se efectuaron según el método establecido por la US Pharmacopea[1].

2.4 Color y olor

Todas las muestras fueron examinadas para determinar variación en el olor. De igual modo fueron estudiadas para detectar cambios en el color. El fabricante de la pancreatina, realizó los estudios de actividad enzimática a la muestra control y a las muestras irradiadas a diferentes dosis.

3. Resultados y Conclusiones

3.1 Resultados

En lo que se refiere a las pruebas dosimétricas, los resultados fueron los siguientes, en aire el valor de la tasa de dosis fue de 13.26031 ± 0.39 kGy/hr siendo el error de 0,46% comparado con la tasa de dosis del fabricante. El mapeo de la dosis del producto en la cámara de irradiación determinó una tasa de dosis mínima de 9.1880 kGy/hr y una tasa dosis máxima de 15.2306 kGy/hr. La uniformidad de dosis hallada fue de 1.66, valor dentro del rango esperado para el equipo de irradiación y el peso del producto. La lectura del dosímetro de etanol clorobenceno, colocado en el sitio de dosis mínima indicó variaciones menores al 10%.

En lo referente a las pruebas microbiológicas, la Tabla 1 muestra los resultados de los ensayos realizados.

La coloración Gram, realizada a la muestra control, sin irradiar, y a las muestras irradiadas a diferentes dosis indicó la presencia de bacilos Gram +, esporulados. La coloración de Wirtz verificó la presencia de esporas de posición central.

Se evidencia una disminución de la carga microbiana a medida que aumenta la dosis de radiación. Sin embargo, se observa cierta resistencia en los microorganismos presentes que incluso a la dosis de 3 kGy presentan crecimiento. Esto se debe a que los bacilos esporulados presentes en la pancreatina se distinguen de otros aerobios mesófilos por su mayor radioresistencia [6,7]. Las muestras irradiadas con 5 kGy muestran la reducción de 3 ciclos logarítmicos.

Tabla 1: Pruebas microbiológicas en pancreatina.

Prueba[UFC/g]	Dosis[kGy]				
	0	2	3	5	8
Recuento Total Microorganismos Aerobios Mesófilos	3000	200	110	< 10	< 10
Recuento Total de Hongos	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Detección de patógenos	Ausencia	--	--	--	--

En la Tabla 2 se muestran los valores promedio de los % de humedad obtenidos de las muestras control e irradiadas.

Tabla 2: Porcentaje de humedad en muestras de pancreatina irradiada.

Dosis [kGy]	% de Humedad
0	2.8410
2	3.0059
3	2.7253
5	2.9146
6	2.8004
7	2.9434
8	2.8568
13	2.7660
25	3.0605

Los valores se encuentran dentro del rango, estipulado por la US Pharmacopea para la pancreatina en polvo, equivalente al 5% de humedad.

El fabricante del producto reportó que la actividad enzimática de la pancreatina desde la dosis 2 kGy a 8 kGy no había variado significativamente. Este dato corrobora el resultado presentado por Kairiyama *et al.* [5].

3.2 Conclusiones

- El producto sin irradiar no cumplía con las especificaciones establecidas por la Pharmacopea USA, lo que no permitía su uso comercial
- Las pruebas dosimétricas permiten la aplicación precisa y segura de las dosis de radiación establecidas.
- A la dosis de 5 kGy se logra la descontaminación del producto.
- La dosis relativamente alta de radiación que se requiere para descontaminar la pancreatina se debe, no sólo al tipo de microorganismos presentes en el producto sin también al bajo contenido de humedad de la pancreatina.

- La irradiación del producto, incluso a 25 kGy no afecta su contenido de humedad
- El color y el olor de la pancreatina no se alteran significativamente luego de irradiada incluso a 25 kGy
- Las propiedades enzimáticas de la pancreatina no se alteran significativamente a la dosis de 5 y 8 kGy.

Finalmente, según este estudio la pancreatina en polvo se descontamina mediante radiación gamma, aplicando una dosis mínima de 5 kGy. El tratamiento del producto con radiación ionizante permite su uso comercial por la industria médico-farmacéutica.

4. Agradecimientos

Se agradece el apoyo brindado por la Química Anita Robles para la realización de las pruebas de contenido de humedad.

5. Bibliografía

[1] US Pharmacopea XXVIII (2005), 1460-1461; 2246-225; 2429.

[2] Izquierdo A., Sabatier F., León R., *et al.* "Uso de las enzimas digestivas en el tratamiento de la diarrea persistente" *Rev Cubana Pediatr.* 1998; 70(1): 22-26.

[3] Matamala García M., "Algunos Aspectos de la Terapéutica Inmuno-Biológica de los Tumores Malignos". *Revista para la Salud de la Asociación "Amigos de Honduras"* Comunicación N° 3 (Marzo, 2003).

[4] Libicky A, Pipota J, Fidlerova J. "The effect of ionising radiation on enzymes". *Cesk Farm.* 1992; 3-10.

[5] Kairiyama E, Narvaiz P. "Decontamination of pancreatin powder by gamma irradiation." *Journal of Radiation Physics and Chemistry.* (1997; 49:399-401.

[6] Von Sonntag C. "The Chemical Basis of Radiation Biology - Enzymes" Taylor and Francis Ltd. 1987. p. 429-449.

[7] IAEA. "Manual of Radiation Sterilization of Medical and Biological Materials de irradiación- Effect of Ionizing Radiation on Bacteria". Technical Reports Series N° 149, 1973. p. 37-63.

[8] Tallentire A. "Radiation Resistance of spores". *Journal of Applied Bacteriology.* 1970; 33:141-6.

[9] Norma ASTM E 1026-04 "Using the Fricke Reference Standard Dosimetry System".

[10] Norma ASTM 51538:2002 (E) "Standard Practice for Use of the Ethanol-Chlorobenzene Dosimetry System".