

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**METODOS DE ELIMINACION DE PIROGENOS EN
COBAMAMIDA (DIBENZOCOZAMIDA) UTILIZADA
EN LA ELABORACION DE UNA SOLUCION
INYECTABLE**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:**

MIGUEL ANGEL IBAÑEZ VILLANUEVA

1 9 8 3



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE**PAGINA**

Introducción -----	1
Objetivo -----	3
Generalidades -----	4
1) Definición de pirógenos -----	4
2) Mecanismo de acción de los pirógenos -----	5
3) Métodos para detectar pirógenos -----	6
4) Métodos para eliminar pirógenos -----	9
4.1) Filtración de profundidad -----	10
4.2) Métodos usando carbón activado -----	13
4.3) Osmosis inversa -----	15
4.4) Resinas intercambiadoras de iones -----	15
4.5) Filtración de superficie o filtración molecular -----	16
Trabajo experimental -----	34
1) Filtración de profundidad -----	34
2) Filtración molecular -----	39
3) Prueba piloto -----	43
4) Proceso a escala industrial -----	47
Resultados -----	52
Resumen y conclusiones -----	57
Referencias bibliográficas -----	61

INTRODUCCION:

Las preparaciones inyectables están constituidas por soluciones, suspensiones o emulsiones estériles, destinadas a la administración por diferentes vías, como subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intrarraqúidea, intraarticular, etc (1).

Debido a que éstos preparados se introducen al organismo superando sus defensas primarias (piel), es preciso un control muy severo sobre su esterilidad, inocuidad y la tolerancia por parte de los tejidos.

Por lo tanto los ingredientes de la formulación deben ser óptimos y los procesos de elaboración deben ser seleccionados y diseñados de tal manera que se elimine cualquier tipo de contaminación. La preparación de soluciones inyectables incluye el proceso aceptado como normal de elaboración.

- a) Pesado de materias primas
- b) Disolución de materias primas
- c) Esterilización por filtración de la solución ya preparada
- d) Envasado de la solución en condiciones acépticas e estériles
- e) Esterilización de la solución envasada en caso necesario

Las soluciones inyectables deben tener el pH lo más cercano a la neutralidad, deben ser isotónicas y libres de partículas (2).

Los ingredientes de la formulación usados en la manufactura de las preparaciones inyectables deben ser

puros, para evitar al máximo una posible contaminación, la cual puede ser física, química o microbiológica. Por lo que a las preparaciones inyectables se les deben hacer las siguientes pruebas de control de calidad.

- a) Control físico
- b) Control químico
- c) Control microbiológico (esterilidad, potencia en caso que lo amerite)
- d) Prueba de toxicidad
- e) Prueba de pirógenos

Los tipos de contaminación más comúnmente observados en las preparaciones inyectables son física, química y microbiológica.

La contaminación física
puede ser originada por;

- a) Partículas en solución
- b) Pequeños cristales provenientes del corte de las ampollitas
- c) Partículas de pelusa procedentes de las fibras del filtro
- d) Partículas de polvo procedentes del medio ambiente
- e) Partículas que permanezcan en las ampollitas aún después del lavado de éstas.

La contaminación química
puede ser originada por:

- a) Emplear materias primas que no cumplen con las especificaciones solicitadas
- b) Que al preparar dos productos diferentes a la vez y no se tenga ninguna precaución, dando lugar a una contaminación cruzada
- c) Que la limpieza del material usado en la elaboración de los inyectables no sea la correcta

La contaminación microbiológica
puede ser ocasionada por:

- a) Limpieza incorrecta o incompleta esterilización del material y equipo empleado en la preparación de los inyectables
- b) No seguir en forma adecuada las buenas prácticas de manufactura

Los pirógenos se encuentran en las soluciones inyectables, como resultado de una contaminación microbiológica.

OBJETIVO:

El objetivo del presente trabajo es, el estudio comparativo de dos métodos para eliminar pirógenos, en la materia prima Colamamida (Dibenzococamida) utilizada en la elaboración de un inyectable.

GENERALIDADES:

1) DEFINICION DE PIROGENOS

Los pirógenos son producto del metabolismo de las bacterias, se conocen también como endotoxinas, las cuales están constituidas por dos componentes principales, lípidos unidos covalentemente y heteropolisacáridos, en contrándose también un bajo porcentaje de proteínas, así como calcio, magnesio y sodio (3).

Siendo un hecho que los pirógenos son producto del metabolismo de las bacterias, en especial de las gram negativas, debe esperarse que donde haya desarrollo de éstas, se encuentren los pirógenos.

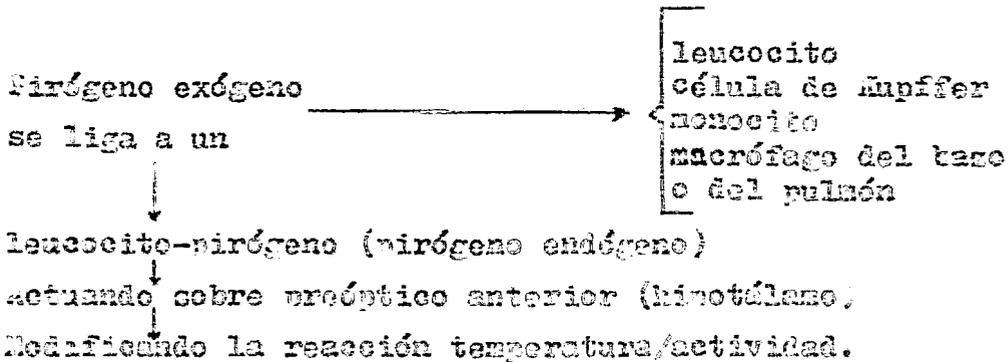
El ambiente de los laboratorios, los instrumentos de trabajo, el agua y las materias primas contienen bacterias que viven, se desarrollan y producen pirógenos. Esta contaminación es muy importante, puesto que cuando se administra un medicamento que los contiene, se produce una reacción febril que se manifiesta poco después de la aplicación del producto y que puede adquirir extraordinaria gravedad, se acompaña generalmente por una respiración deficiente, cianosis, cefalea, sudor intenso, escalofríos, náusea, vómitos y otros trastornos gastrointestinales (4).

2) MECANISMO DE ACCION DE LOS PIROGENOS

Se han realizado algunos estudios (5) para conocer el mecanismo de acción de los pirógenos.

Los pirógenos denominados, pirógenos exógenos, que son inyectados al organismo junto con los medicamentos, se pueden ligar a un leucocito, a una célula de Kupffer, a un monocito o bien a un macrófago del bazo o del pulmón, rompiendo la célula a la cual se ligan; dando lugar a un complejo llamado pirógeno endógeno, el cual va a actuar principalmente sobre una zona del hipotálamo, conocida como preóptico anterior, ocasionando que se modifique la reacción temperatura/ actividad, que trae como consecuencia la elevación de la temperatura corporal y todas las otras reacciones que se presentan cuando se administran medicamentos que contienen pirógenos.

MECANISMO DE ACCION DEL PIROGENO



Este mecanismo nos muestra que la acción del pirógeno es en forma indirecta.

3) MÉTODOS PARA DETECTAR PIRÓGENOS

Debido al alto riesgo que se presenta cuando se administran medicamentos contaminados con pirógenos, se han desarrollado varios métodos para llevar a cabo la detección de la contaminación pirogénica, en los medicamentos que son administrados por vía parenteral. Los métodos son (6,7,8):

- a) Por reacción térmica
- b) Empleando el lisado de amebocitos de *Limulus*
- c) Por recuento de glóbulos blancos

Método por reacción térmica (reacción febril en el conejo) (c)

Los pirógenos o endotoxinas al ser inyectados por vía intravenosa al animal, interactúan con las células de éste (leucocitos principalmente) activándolas y haciendo que liberen pirógeno endógeno, éste actúa en el área del preóptico anterior del hipotálamo observándose un aumento en la temperatura rectal.

Se emplean conejos Nueva Zelanda machos cuyo peso sea entre 1.5 y 2.5 kg, se les debe retirar el alimento antes de la prueba, sólo toman agua (potable). Dos días antes de la prueba, a los conejos se les hace una prueba en blanco inyectándoles agua destilada y libre de pirógenos, para determinar si su temperatura es estable, con objeto de que no existan grandes variaciones en la temperatura basal que debe encontrarse a 39.5°C . Los conejos

que presentan una temperatura mayor, así como los que presentan una variación muy marcada en su temperatura basal son eliminados.

El local donde se realiza la prueba debe ser libre de ruidos para que los conejos no se pongan nerviosos y en consecuencia presenten un aumento de temperatura, también debe controlarse la temperatura y humedad de manera que éstas permanezcan constantes.

El día de la prueba los conejos se trasladan a la zona de prueba de 30 a 45 minutos antes de la misma, durante este lapso se inmovilizan en sus cajas de sujeción y se les coloca el termómetro, ya que están preparados se les toma la temperatura basal.

Diez minutos después a los conejos se les inyectan las muestras previamente calentadas a 37°C en la vena marginal de la oreja. A los 60 minutos se les toma la primera lectura, a los 120 la segunda y a los 180 minutos se les toma la tercera lectura.

La elevación individual de la temperatura de un conejo no debe ser superior a 0.6°C de su temperatura basal y la suma del cambio máximo de 3 temperaturas no debe ser superior a 1.8°C . Si se cumple lo anterior el producto se considera libre de pirógenos. Si no se cumple lo anterior se repite la prueba usando 5 conejos. Los resultados obtenidos con éstos se suman a los obtenidos con los 3 conejos anteriores. Si no más de 3 conejos de los 8 probados muestran una elevación de 0.6°C o más, sobre su respectiva temperatura basal y si la suma de los 3 máximos de temperatura no es mayor de 1.7°C , la muestra satisface las especificaciones relativas de ausencia de pirógenos.

Método empleando el lisado
de amebocitos de *Limulus* (7) :

Fundamento:

Levin y Bang sugieren que la gelificación del lisado de amebocitos de *Limulus* realizada por la endotoxina, se inicia enzimáticamente (9). El examen posterior del gel muestra una matriz de fibras finas cuyo diámetro varía de 50 a 100 micras (10).

La evidencia en los estudios indica que son necesarias 4 sustancias para que se lleve a cabo la reacción; estas sustancias son; la enzima pro-coagulante, las proteínas coagulantes (coagulógeno), cationes divalentes principalmente iones calcio y lipopolisacáridos de bacterias gram negativas. La reacción se inicia probablemente con la activación de la enzima procoagulante por los iones calcio y la endotoxina (pirógeno).

Para realizar este método es necesario un control positivo preparado con endotoxina de *E. coli* y un control negativo. Cuando se va a realizar la prueba es necesario probar el pH de la solución a tratar, el cual debe ser de 6.0 a 7.5, si se encuentra fuera de estos valores se debe ajustar con NaOH 0.1 molar o bien con HCl 0.1 molar estéril y libre de pirógenos.

Si no se ajusta el pH de la muestra se puede producir la gelificación pero ésta será incompleta, dando lugar a un gel firme pero frágil el cual en el momento de invertirlo puede romperse dificultando la lectura de los resultados.

En este método se efectúa la detección de endotoxinas *in vitro*, por la reacción que se produce frente a un preparado de lisado de amebocitos de *Limulus*, siendo una reacción de tipo antígeno-anticuerpo.

Recuento de glóbulos blancos (8)

Este método tiene como fundamento el conteo de leucocitos del conejo, el cual se lleva a cabo 30 minutos después de la inyección de la cantidad especificada en la monografía de cada producto, en estas condiciones ocurre una disminución en el número de glóbulos blancos (cantidad normal 8 000 /mm³), luego de la disminución de leucocitos sigue un incremento de los mismos; podemos considerar que una variación de 4 000 leucocitos (existiendo variaciones que se consideran normales hasta de 2 000) es provocada por la presencia de pirógenos en la solución administrada.

4) MÉTODOS PARA ELIMINAR PIROGENOS

La presencia de pirógenos en las soluciones inyectables es totalmente indeseable por lo cual al preparar éstas, debe vigilarse cuidadosamente este aspecto. Una vez presentes en las soluciones inyectables, deben eliminarse.

Los métodos de esterilización como autoclave, horno, filtración, válidos para la eliminación de microorganismos no lo son para la eliminación de pirógenos, debido a esto se han buscado otros métodos que sean efi-

caces en la eliminación de los pirógenos. Tomando en cuenta las propiedades físico-químicas de las soluciones a tratar, los métodos más usados son (11, 12, 13, 14, 15).

- 1) Filtración de profundidad
- 2) Uso de carbón activado
- 3) Ósmosis inversa
- 4) Filtración de superficie
- 5) Resinas de intercambio iónico

Otros métodos usados con menos frecuencia son (16)

- 6) Quelación con polivinilpirrolidona
- 7) Electroósmosis
- 8) Radiación gamma
- 9) Ultrasonido
- 10) Tratamiento con peróxido de hidrógeno
- 11) Acción hidrolítica del ácido clorhídrico e hidróxido de sodio

4.1) Filtración de profundidad;

La filtración es el paso obligado a través de un medio filtrante o poroso, en el cual quedan retenidas solamente las partículas sólidas, no así el líquido que lo atraviesa.

Las fuerzas utilizadas pueden ser, la simple gravedad, la aplicación de una presión positiva o negativa (vacío) o bien una fuerza centrífuga.

El medio utilizado para efectuar la filtración es un filtro. En el caso de la filtración de profundidad, el mecanismo mediante el cual se retienen las partículas sólidas en el filtro puede ser:

- Si el tamaño de una partícula es mayor que el tamaño del poro del medio filtrante, ésta quedara en consecuencia retenida.
- Si el tamaño de partícula es menor que el tamaño del poro, el proceso es por adsorción de la misma sobre las paredes internas de los poros o canalículos de la masa filtrante, es probable que este proceso esté auxiliado por un fenómeno de origen electrostático.
- Un mecanismo intermedio donde, partículas de tamaño algo menor al diámetro del poro, al aglomerarse obturen parcialmente al mismo, permitiendo así por disminución aparente de la sección de pasaje, la retención de partículas de tamaño muy inferior al poro del filtro.

El líquido que atraviesa el medio filtrante al inicio de la filtración pasará turbio hasta que se forme esta capa previa de partículas.

En la filtración de profundidad existen algunos filtros que dentro de su estructura poseen fibras de asbesto, teniendo estas fibras una acción antipirogénica, en algunas ocasiones la acción antipirogénica del asbesto puede desaparecer por la pérdida de adsorción.

Cuando existen en la formulación sustancias que presentan propiedades de adsorción tales como clorhidrato de procaina, clorhidrato de efedrina, epinefrina, éstas quedarán adsorbidas en las fibras del filtro, ocasionando la pérdida de la acción antipirogénica del medio

filtrante, como consecuencia este método no se debe considerar como un método universal para la eliminación de pirógenos en líquidos inyectables.

La aplicación de este método va a depender del nivel de contaminación y de las propiedades fisicoquímicas de la solución a filtrar (17). Por ejemplo un filtro de este tipo es la membrana EKS 2, la cual está constituida de celulosa y fibras de asbesto, ésta es de fácil obtención en el mercado, además de tener un comportamiento efectivo en la eliminación de pirógenos de algunas soluciones tales como las de proteínas (18).

En el filtro de asbesto (Amianto) el mecanismo mediante el cual se efectúa la eliminación de los pirógenos, esta basado en las propiedades mecánicas y electrocinéticas del asbesto (19,20), ya que éste presenta cargas positivas sobre su superficie y cuando esta en contacto con las soluciones acuosas presenta un potencial zeta positivo.

Ciertas partículas en suspensión acuosa y dispersiones coloidales, algunos microorganismos y ciertas moléculas tienen un potencial zeta negativo.

Por lo que al tener cargas opuestas el medio filtrante y las partículas, éstas quedarán retenidas en el filtro.

En la figura 1 se muestra la variación del potencial zeta del asbesto con respecto al pH.

Algunos estudios (21) han demostrado que estos filtros liberan pequeñísimas fibras de asbesto (100 micrones de longitud) y al filtrar la solución son arrastradas quedando en ésta, estas fibras representan un peligro pues se han reportado como causantes de procesos oncogénicos (22, 23).

Esta contaminación es tan importante que asociaciones como FDA han prohibido el uso prolongado de esta clase de filtros en la industria farmacéutica.

4.2) Método usando carbón activado

Algunos autores afirman la acción despirogénizante del carbón activado (24). La cantidad de carbón activado y el tiempo de contacto dependen del grado de contaminación y del tipo de bacteria que produce el pirógeno. En general se emplea en concentraciones del 5 % en condiciones normales. El uso de este agente quedará limitado a aquellas soluciones que no contengan sustancias que se pueden adsorber como alcaloides, colorantes, etc.

La técnica consiste en tratar las soluciones con carbón activado, seguido por sucesivas filtraciones. En general puede utilizarse este método tan simple, siempre que no haya muchos pirógenos ni en la sustancia ni en el agua.

En el caso de que la sustancia o el agua contengan una gran cantidad de pirógenos, puede procesarse por ultracentrifugación seguida del tratamiento con carbón activado, al usar este método se debe cuidar de no dejar partículas de carbón en la solución.

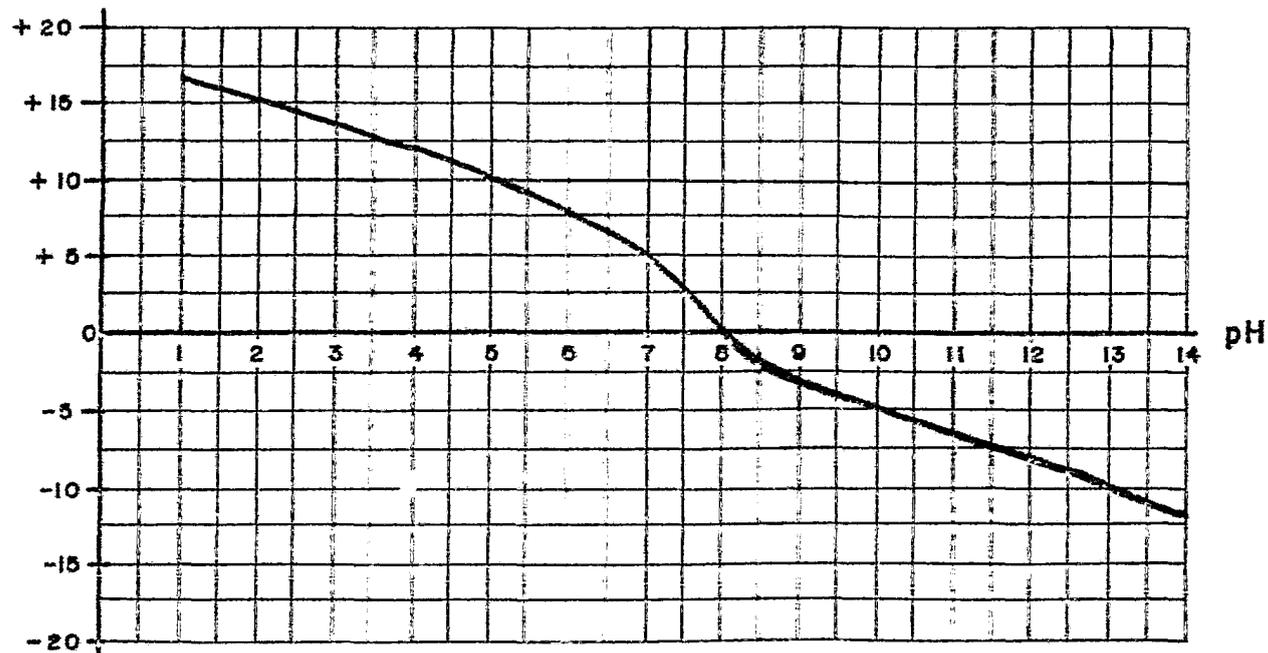


FIGURA No-1
VARIACION DEL POTENCIAL ZETA DEL ASBESTO
EN FUNCION DEL pH

4.3) Ósmosis inversa

La ósmosis es el proceso en el cual un líquido pasa de una solución más diluida a una solución más concentrada a través de una membrana semipermeable.

En la ósmosis inversa por el contrario, se aplica una presión sobre la solución más concentrada, de esta forma pasa a través de la membrana semipermeable el líquido que va a estar libre de las sustancias contaminantes. Este método se puede aplicar para liberar a las soluciones de los contaminantes más comunes(25), éstos son partículas, microorganismos, sustancias inorgánicas disueltas y pirógenos. El mecanismo de la ósmosis inversa es, repeler a los iones de acuerdo a su carga y masa. Una sustancia orgánica puede eliminarse de la solución a tratar de acuerdo a su peso molecular y carga. Las partículas coloidales de algunas soluciones, son eliminadas mecánicamente debido al tamaño de poro y la selectividad de la membrana semipermeable.

4.4) Resinas intercambiadoras de iones

En los trabajos publicados por T.D. Whittet(15), se hace mención al empleo de Zeocarb 225 como intercambiador catiónico y Deacidité FF como aniónico.

En estos estudios se pretende conocer si existe algún mecanismo como por ejemplo adsorción por parte de las resinas para fijar pirógenos. Otra observación hecha en estos estudios fue, determinar si una de las dos recí

nas o las dos son las responsables de la depirogenización.

Los resultados muestran que la columna de Zeocarb 225 es incapaz de retener pirógenos, en contraposición con el segundo (Deacidite FF), con el cual se logran efectos altamente satisfactorios. De estos estudios se puede concluir que al menos algunos pirógenos tienen carga negativa por lo que pueden ser captados por la resina aniónica.

B. Blazkova y Z. Fovkal, (26) recomiendan un procedimiento de purificación y depirogenización de soluciones de albumina usando amberlita XE 64 ó IRC 50 .

4.5) Filtración de superficie (Filtración molecular)

La filtración de superficie se conoce también como filtración de tamiz, estos filtros retienen las partículas sobre su superficie(27), es decir las separan físicamente del líquido.

La retención más que un fenómeno de profundidad es un fenómeno de superficie. La estructura del filtro es normalmente rígida, uniforme y continua, la característica más valiosa de un filtro de tamiz es la facultad de retener absolutamente todas las partículas sobre su superficie, tanto las biológicas como las no biológicas mayores al tamaño del poro de un filtro predeterminado.

Las ventajas de la filtración de superficie son;
- Es un filtro absoluto cuya eficiencia se afecta por variaciones en la velocidad de flujo o diferencias de presión.

- La estructura es homogénea y continua. Por lo tanto no se produce migración del medio a la solución.
- Dado que los microorganismos más grandes que el tamaño de los poros no pueden penetrar en la matriz del filtro; la reproducción de los mismos no constituye ningun riesgo.
- Debido a que el área de superficie interna es pequeña los filtros de tamiz absorben poco de la solución.
- Como los filtros de tamiz poseen una estructura verdaderamente capilar, pueden ser controlados respecto a su integridad en el momento previo a la filtración, empleando un ensayo simple no destructivo denominado "PUNTO DE BURBUJA".

Dentro del campo de la filtración de superficie se encuentra una técnica denominada "FILTRACION MOLECULAR O ULTRAFILTRACION". En esta técnica se efectua una separación de moléculas basándose en su tamaño(28) y como consecuencia en su peso molecular. El método sirve para separar moléculas disueltas, haciendo pasar la solución a través de una membrana semipermeable.

La membrana filtrante es selectiva, resistente, delgada y retiene practicamente todas las moléculas mayores de un tamaño dado, mientras que permite pasar al filtrado casi todas las moléculas más pequeñas, incluyendo el disolvente.

De esta manera la filtración molecular brinda una fracción retenida que es enriquecida con moléculas de alto peso molecular y un filtrado que contiene pocas o ninguna de estas moléculas.

Otro tipo de membrana es aquella cuya estructura está constituida por polisulfonas, ésta funciona separando las moléculas en dos flujos, uno llamado retenido en el cual se encuentran las moléculas de peso molecular alto, al otro se le llama filtrado en el cual se encuentran las moléculas de peso molecular bajo.

Si hacemos una observación hacia adentro de la membrana se verá que la componen dos membranas ligadas entre si, al sistema se le conoce como emparedado, se le llama así porque la muestra corre por encima de él, quedando fuera de la membrana el retenido y por dentro el filtrado, la retención de las moléculas va a depender de su tamaño y de su forma.

Es conveniente describir las propiedades de la membrana con base al peso molecular de la sustancia disuelta, por lo tanto a cada membrana se le da un límite nominal de peso molecular (LNPM), que es el peso molecular límite al cual son eficientemente retenidas las moléculas por la membrana filtrante.

Lo más conveniente resulta considerar el (LNPM), como una guía aproximada del rango de peso molecular o de dimensión para el que es más eficiente cada tipo de membrana filtrante, estos límites no deben considerarse como barreras absolutas. Pero no conviene intentar separar una molécula de peso molecular 23 000 de una de peso molecular 25 000 utilizando una membrana con un LNPM de 25 000.

A continuación se presentan algunos ejemplos de diferentes límites nominales de peso molecular (Membranas Millipore Corning).

PRESENTACION	LNPM	ABRA
Paquete*	10 000	464.4 cm ²
Cartucho++	10 000	4645.0 cm ²
Paquete	100 000	464.5 cm ²
Cartucho	100 000	4645.0 cm ²

Otros tipos de límites nominales son;

SERIE	LNPM
PSAG	1 000
PSED	25 000
PSVP	1 000 000

Paquete* se refiere a una sola membrana

Cartucho++ es un paquete de 10 membranas, el cual tiene por objeto ofrecer una mayor superficie filtrante.

La descripción de la celda de filtración molecular (figura 2) es la siguiente. Consta de dos placas exteriores de metal, forradas de polietileno(A), las cuales están sostenidas por 4 tornillos, que unirán estas dos placas exteriores con dos placas interiores de acrílico pulido(B). En medio de las dos placas de acrílico pulido se coloca la membrana de filtración molecular y entre la membrana y las placas de acrílico se colocan en la parte superior e inferior los separadores(C), cuya función es permitir que la solución al ser introducida en la celda de filtración pueda desplazarse por las dos superficies de la membrana (superior e inferior).

Físicamente el sistema de filtración molecular ocupa un espacio muy pequeño (menos de 0.9 m^2) . Pudiendo dar superficies de filtración desde 0.450 m^2 hasta 5 m^2 .

Las partes que forman la celda de filtración molecular pueden ser de acrílico pulido, aluminio, acero recubierto con silicón y poliéster. La función de las placas de acrílico presentes en la celda es, servir como conducto por el cual se administra la solución a separar en la celda de filtración molecular y de la cual se obtienen dos flujos (retenido y filtrado).

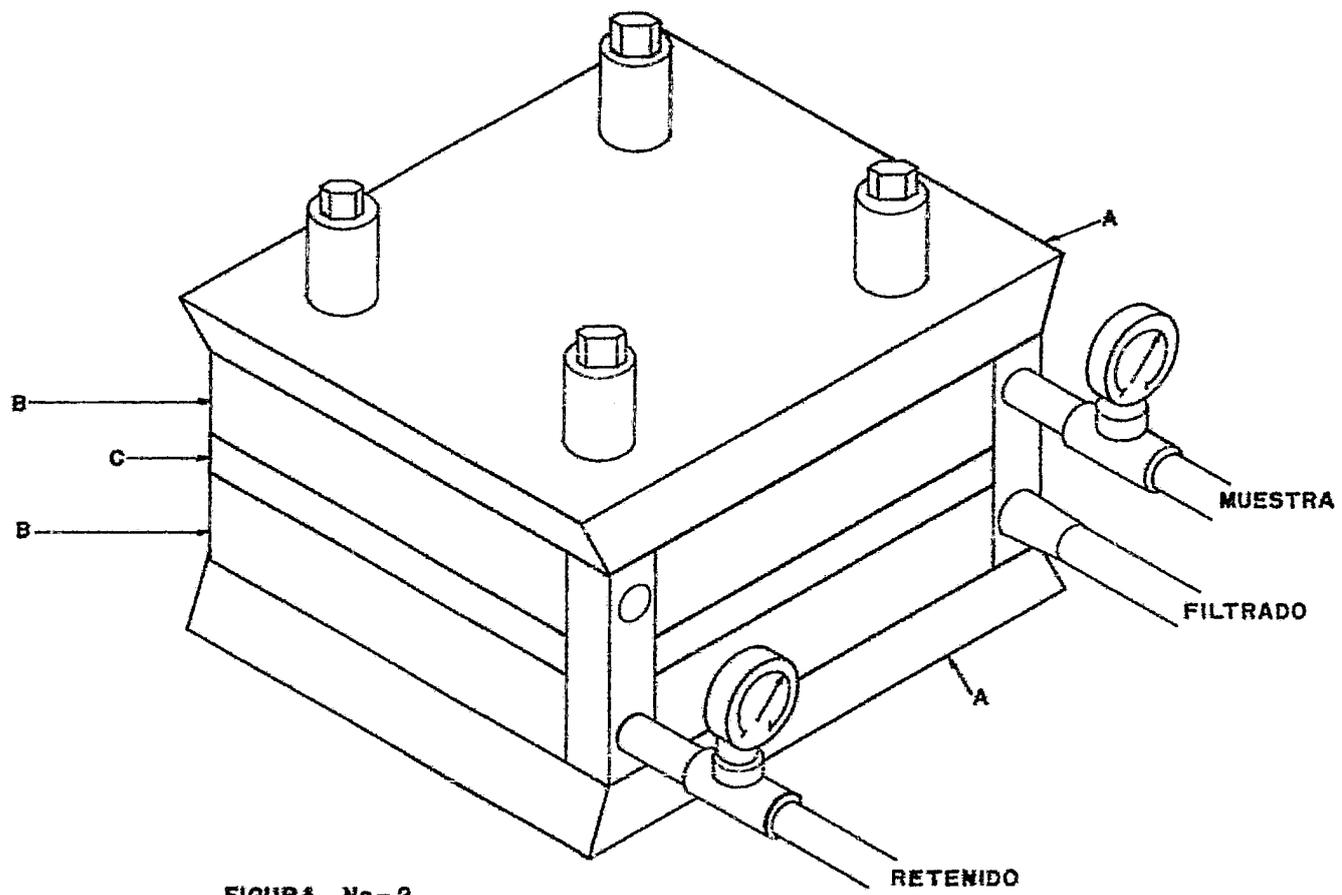


FIGURA No.-2
CELDA DE FILTRACION MOLECULAR.

El diseño de las placas de acrílico pulido es el siguiente, la placa superior consta de dos tubos horizontales A y B (figura 3), el tubo A tiene 4 pequeños tubos llamados múltiplos que van a estar en contacto directo con la superficie del separador el cual soporta la membrana, el tubo B tiene 5 pequeños tubos o múltiplos que están en contacto con el separador que soporta la membrana. La placa inferior consta de dos tubos horizontales C y D (figura 3), el tubo C tiene 5 tubos o múltiplos, que van a estar en contacto con el separador el cual soporta la membrana, el tubo D consta de 4 múltiplos que están en contacto con el separador que soporta la membrana, las placas se colocan de manera que el tubo A coincida con el tubo C y el tubo B con el D como se ilustra en la figura 3 .

En la figura 4 se observa la membrana utilizada en filtración molecular, ésta consta de 9 perforaciones en sus extremos, rodeadas por una sección sellada, la membrana debe colocarse en la celda de filtración de manera que las perforaciones 1,3,5,7,9 coincidan con los 5 múltiplos del tubo B de la placa superior y los 5 múltiplos del tubo C de la placa inferior. Quedando las perforaciones 2,4,6,8 coincidiendo con los 4 múltiplos del tubo A de la placa superior y con los 4 múltiplos del tubo D de la placa inferior.

Esta forma de colocar la membrana en la celda, hace que los conductos con 5 múltiplos queden en contacto sólo con la parte externa de la membrana llevando el retenido; en forma similar los conductos con 4 múltiplos quedan en contacto sólo con la parte interna de la mem-

brana llevando el filtrado.

Cuando se alimenta una muestra a la celda de filtración se esta obligando a entrar a la solución por un conducto que tiene 5 múltiplos (tubo B figura 3), ésta fluye sobre el lado externo de la membrana.

Cualquier concentrado que permanezca fuera de la membrana es forzado a salir de la celda, por la presión que ejerce la muestra que alimenta a la celda de filtración. El fluido que se encuentra dentro de la membrana esta formado por una solución que contiene sustancias de bajo peso molecular, éste debe salir por alguno de los conductos que tienen 4 múltiplos (tubo A o D figura 3), es decir se forman dos flujos simétricos pero independientes, estos flujos pasan por la membrana como se indica en la figura 5. Otra característica de este tipo de flujo es el comportamiento ondulante sobre la superficie de la membrana como se muestra en la figura 6, este flujo es excepcionalmente efectivo, pues retiene las moléculas mayores sobre la superficie de la membrana y disminuye el efecto polarizante sobre la superficie de la misma.

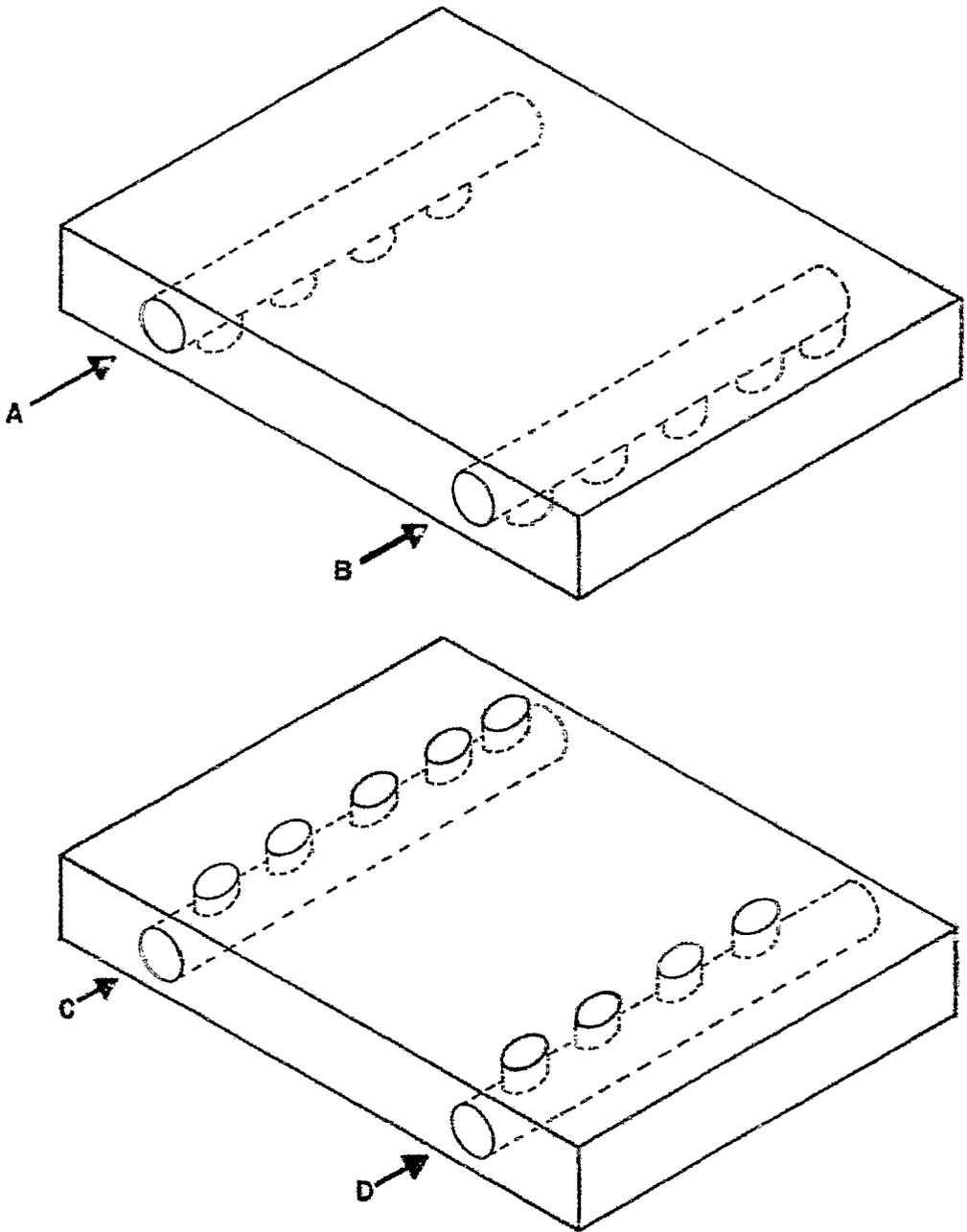


FIGURA No.-3

**DISEÑO DE LAS PLACAS DE ACRILICO PULIDO, CONTENIENDO
LOS CONDUCTOS POR LOS CUALES SE ADMINISTRA LA MUESTRA A
SEPARAR Y SE OBTIENE EL FILTRADO Y RETENIDO.**

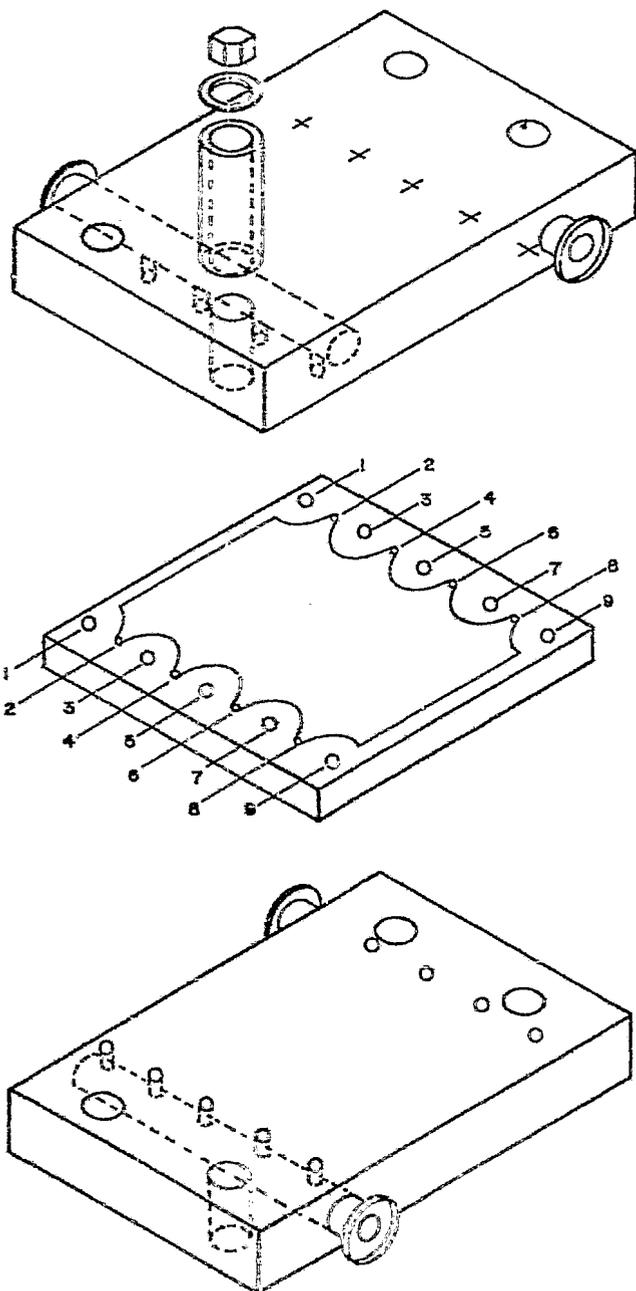


FIGURA No. 4

DISEÑO DE LA MEMDRANA UTILIZADA EN LA TECNICA DE FILTRACION MOLECULAR.

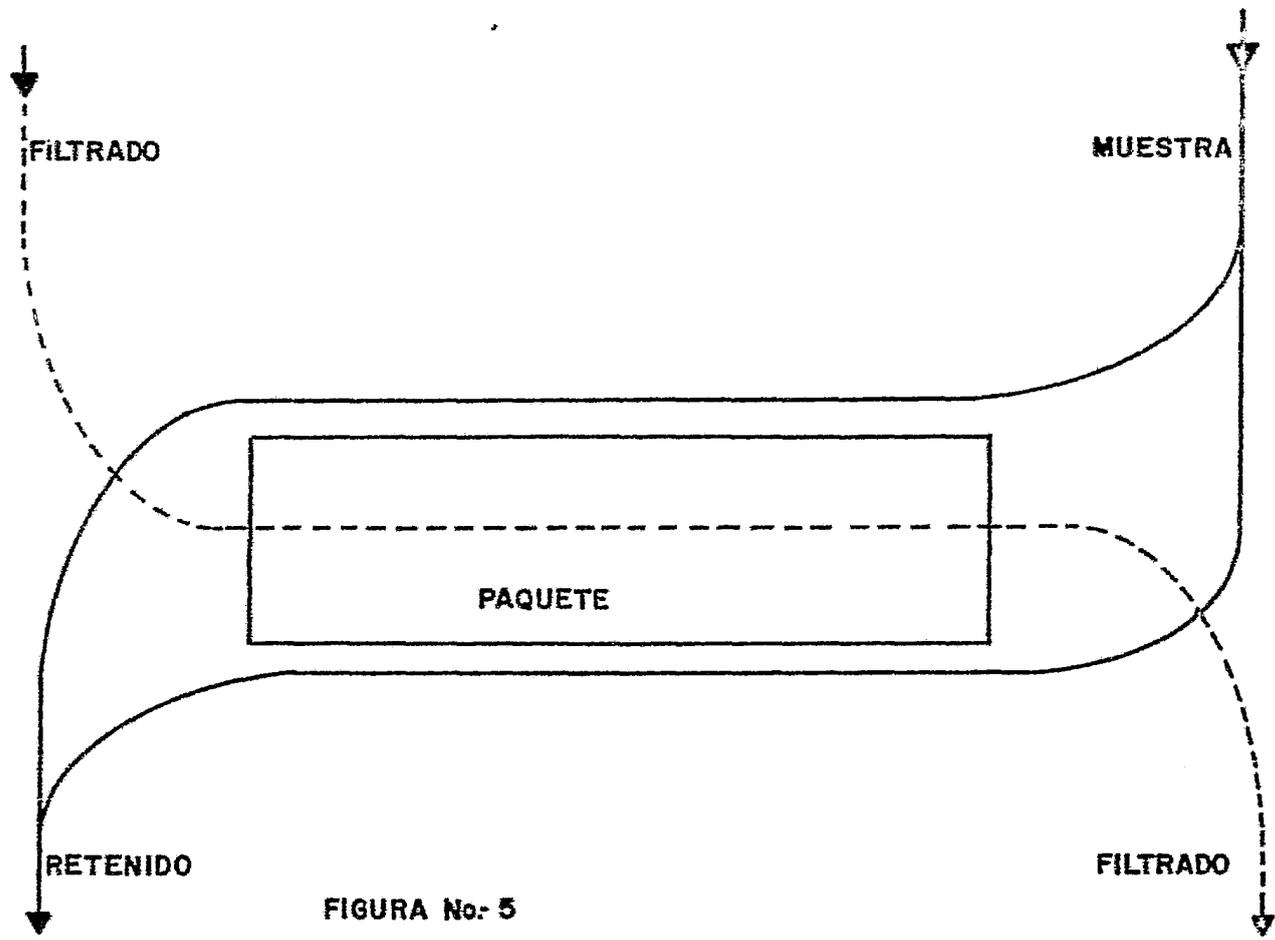


FIGURA No- 5
SIMETRIA E INDEPENDENCIA DE LOS FLUJOS FORMADOS
EN LA CELDA DE FILTRACION MOLECULAR

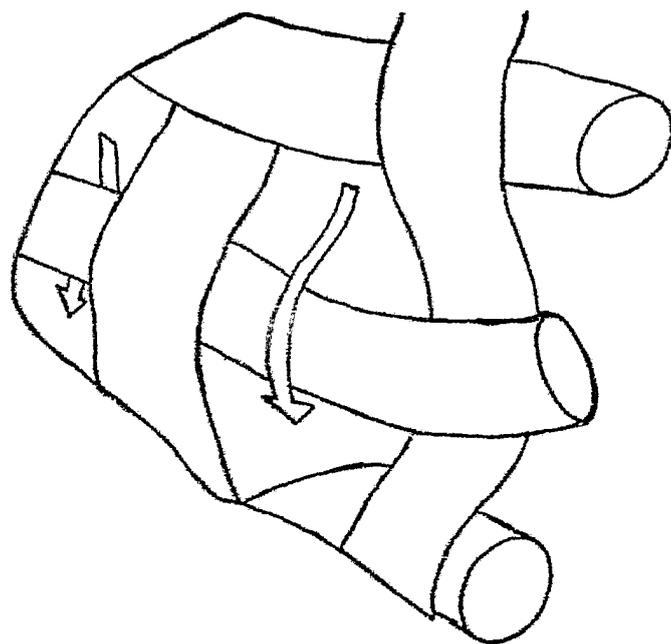


FIGURA No-6

COMPORTAMIENTO DEL FLUJO
EN LA MEMBRANA.

Se deben tener presentes ciertas consideraciones antes del uso de la membrana en el proceso de filtración.

- Debe hacerse una prueba de integridad de la membrana
- Probar la compatibilidad de la membrana con la muestra a filtrar. Los componentes que forman la estructura de la membrana presentan compatibilidad con sistemas acuosos, que tienen un rango de pH de 1 a 14, con soluciones alcohólicas al 50 % e hidrocarburos alifáticos, la temperatura máxima de trabajo recomendada es de 50°C.
- Los componentes de la estructura de la membrana presentan incompatibilidades con cetonas, esteres, hidrocarburos aromáticos, etc.
- No se debe permitir el contacto del óxido de etileno líquido con la membrana.
- La membrana debe limpiarse cada vez que se use y en algunas ocasiones, se debe limpiar entre filtración y filtración.
- No se recomienda su esterilización en autoclave, pues se presentan variaciones en el tamaño de la membrana, ya que se haran más anchas o más angostas con el calor del autoclave.
- Almacenamiento. Para tener un adecuado almacenamiento se debe limpiar perfectamente la membrana, después introducirla en un recipiente con glicerol al 10 % con azida de sodio o formalina al 1 %, introducirla en una bolsa de polietileno, sellarla y mantenerla en refrigeración.

La celda de filtración molecular puede utilizarse en diferentes formas:

- a) Paso simple de flujo
- b) Flujo recirculante
- c) Flujo a contracorriente

Paso simple de flujo (figura 7)

Es el método más sencillo de uso y el más eficiente en cuanto al aprovechamiento de la energía desarrollada por una bomba. El paso simple de flujo se utiliza en procesos en forma de línea continuos.

El sistema puede ajustarse en la forma que se desee, pasando el producto a través de la celda y así poder obtener el filtrado y el retenido en diferentes recipientes, la muestra se pasa por la celda usando una bomba o bien presión de gas.

Flujo recirculante (figura 8)

En este caso es necesario usar una bomba, este proceso se utiliza cuando se desea remover más fluido de la muestra que el que se separa por paso simple de la solución, a través de la celda de filtración molecular.

Este proceso puede aplicarse a soluciones muy concentradas o muy viscosas y obstruyan la parte superior de la membrana, la cual habra que limpiar continuamente para que sea posible la separación de las moléculas.

Flujo a contracorriente (figura 9)

Se emplea para la diálisis rápida. Dos flujos separados circulan en direcciones opuestas, uno por una superficie de la membrana y el otro por la otra superficie de la membrana, el proceso se continua hasta que se tenga la suficiente pureza.

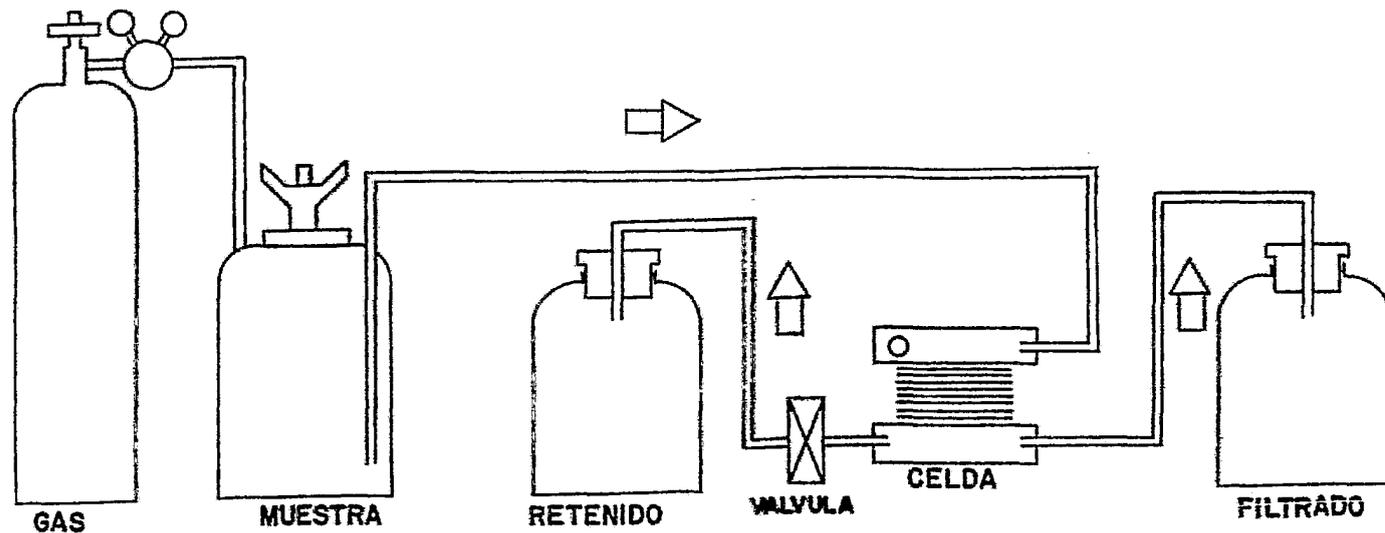


FIGURA No.- 7
PASO SIMPLE DE FLUJO

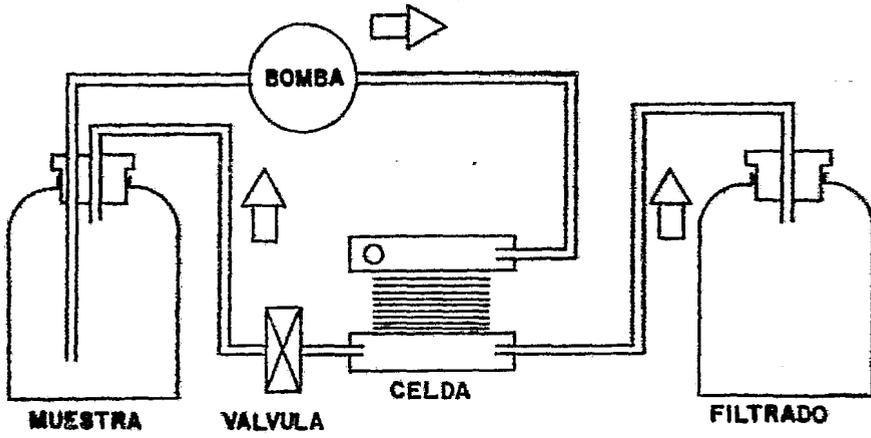


FIGURA.No.-8
FLUJO RECIRCULANTE

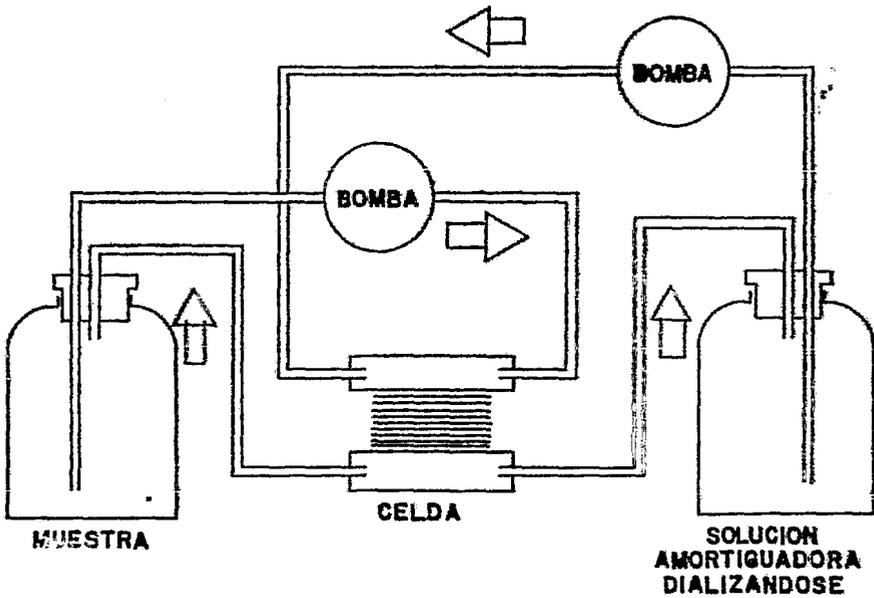


FIGURA No.-9
FLUJO A CONTRACORRIENTE

TRABAJO EXPERIMENTAL

Se probaron dos métodos para la eliminación de los pirógenos de una sustancia (Cobamamida) que se utiliza en la preparación de una solución inyectable.

- a) Filtración de profundidad
- b) Filtración de superficie o filtración molecular

Se eligieron estos métodos ya que son accesibles en el mercado y porque se han reportado efectivos en la eliminación de pirógenos.

1) Filtración de profundidad

El proceso de filtración de profundidad se efectúa utilizando una placa filtrante del tipo EKS 2. Para conocer la funcionalidad del método se realizó una prueba a escala piloto.

Material:

Portafiltro Sartorius formato 142

Olla de presión Sartorius de 20 litros de capacidad

Manómetros de 4 Kg de capacidad

Mangueras de hule de diámetro interno 8.50 mm y 15.56 mm de diámetro externo

Tapones de hule del número adecuado

Tubo de vidrio de diámetro interno 9.40 mm y de diámetro externo 11.40 mm

Embudos de acero inoxidable de capacidad adecuada
Vasos de acero inoxidable de 4 litros de capacidad
Agitador mecánico
Cilindro de nitrógeno
Placa filtrante de asbesto del tipo EKS 2
Matraz balón de fondo plano de 3 litros de capacidad
Conexiones en Y de tubo de vidrio con un diámetro interno
de 9.40 mm y un diámetro externo de 11.90 mm
Jeringas desechables de 1 y 10 ml de capacidad

Sustancias utilizadas :

Cobamamida

Agua libre de pirógenos obtenida por destilación

Lisado de amebocitos de Limulus

Endotoxina de E. coli

Métodos :

Todo el material utilizado se esteriliza previamente en las condiciones adecuadas para cada tipo.

El material de vidrio antes de lavarlo con agua destilada se trata con mezcla crómica.

Previo a su esterilización la manguera de hule, los tapones de hule, el tubo de vidrio, deben lavarse de la siguiente forma; en un vaso de acero inoxidable limpio, poner la cantidad de agua necesaria para cubrir todo el material que vaya a esterilizarse, hervirlo durante 10 minutos, repetir la operación 3 veces.

El material de vidrio se esteriliza en horno a 300°C durante 3 horas, el material de hule y el porta-filtro conteniendo la placa filtrante se esteriliza en autoclave a 121°C , 1 Kg de presión durante 30 minutos.

En la figura 10 se observan las conexiones efectuadas, para armar el sistema utilizado en la prueba piloto.

Al sistema ya armado se le pasan 40 litros de agua libre de pirógenos y se efectua una prueba con el lisado de amebocitos de *Limulus* al agua que se pasa por el filtro. Sabremos así si existen pirógenos en la estructura del filtro, para que éste pueda utilizarse, la prueba debe ser negativa a la presencia de pirógenos.

Preparación de la solución a tratar. En un recipiente de acero inoxidable libre de pirógenos de 10 litros de capacidad, vaciar 3 litros de agua libre de pirógenos, calentar a 40°C , adicionar 2 g de Cobamamida, agitar hasta disolución completa. Con ayuda de un vaso y un embudo de acero inoxidable pasar la solución del recipiente a la olla de presión, y pasar la muestra a través del filtro usando una presión de nitrógeno de 1 Kg/cm^2 . Dejar pasar los primeros 1 000 ml recibiendo-los en un matraz adecuado. Al llevar aproximadamente 2 000 ml de filtrado, se toma una muestra de 0.1 ml valiéndose de una jeringa de 1 ml (dividida en décimas de ml), y se hace una prueba de presencia de pirógenos utilizando el lisado de amebocitos de *Limulus*.

El resultado obtenido de esta muestra fue, positivo a la presencia de pirógenos.

Se desarmó todo el equipo, se esterilizó, se cambió la placa filtrante por una nueva y se efectuó la prueba por segunda ocasión. Se realizó nuevamente la prueba para detectar pirógenos en la solución filtrada, el resultado obtenido fué, positivo a la presencia de pirógenos.

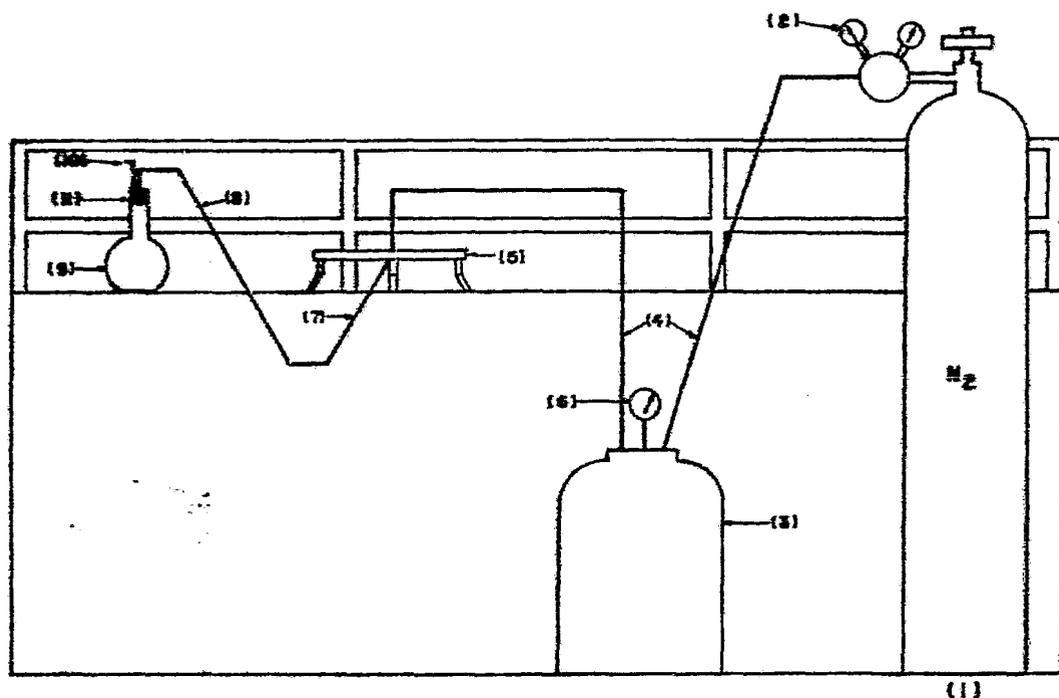


FIGURA No.- 10
REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL SISTEMA
EMPLEADO EN FILTRACION DE PROFUNDIDAD.

- (1) CILINDRO DE NITROGENO.
- (2) MANOMETRO.
- (3) OLLA DE PRESION SARTORIUS DE 20 LITROS DE CAPACIDAD.
- (4) MANQUERAS DE CONEXION RAPIDA SARTORIUS.
- (5) PORTAFILTRO SARTORIUS 142mm. (CON MEMBRANA DE ASBESTO EKS 2).
- (6) MANOMETRO.
- (7) TUBO DE VIDRIO.
- (8) MANQUERA DE HULE.
- (9) MATRAZ BALON DE FONDO PLANO DE 3 LITROS DE CAPACIDAD.
- (10) TUBO DE VIDRIO (QUE SIRVE COMO RESPIRADERO)
- (11) TAPON DE HULE.

2) Filtración de superficie o
filtración molecular:

Se utilizó una celda de filtración molecular Millipore, la técnica se ha reportado(30) efectiva en la eliminación de pirógenos de las soluciones.

La membrana utilizada en el estudio está constituida por polisulfonas y para su selección se siguió el siguiente razonamiento.

- 1) Observar la estructura de la sustancia contaminada con pirógenos.
- 2) Calcular el peso molecular. Tomando como base la fórmula de la Cobamamida(figura 11), el peso molecular de ésta es 1579.57 (31).
- 3) En la tabla 1 se observa la diferencia de pesos moleculares entre dos sustancias pirogénicas(32,33) y el peso molecular de la Cobamamida.

Tabla 1

Sustancias	Peso Molecular
Pirógenos de <i>S. typhosa</i>	62 000.00
Pirógenos de <i>Klebsiella</i>	4.77×10^6
Cobamamida	1 579.57

- 4) Al observar los límites nominales de peso molecular, se ve que existen membranas con un límite nominal de peso molecular de 1 000, 10 000, 25 000, 100 000, y

1 000 000 , si se utiliza una membrana con un límite nominal de peso molecular de 10 000 . Se realiza una adecuada separación de los pirógenos y la sustancia contaminada con éstos.

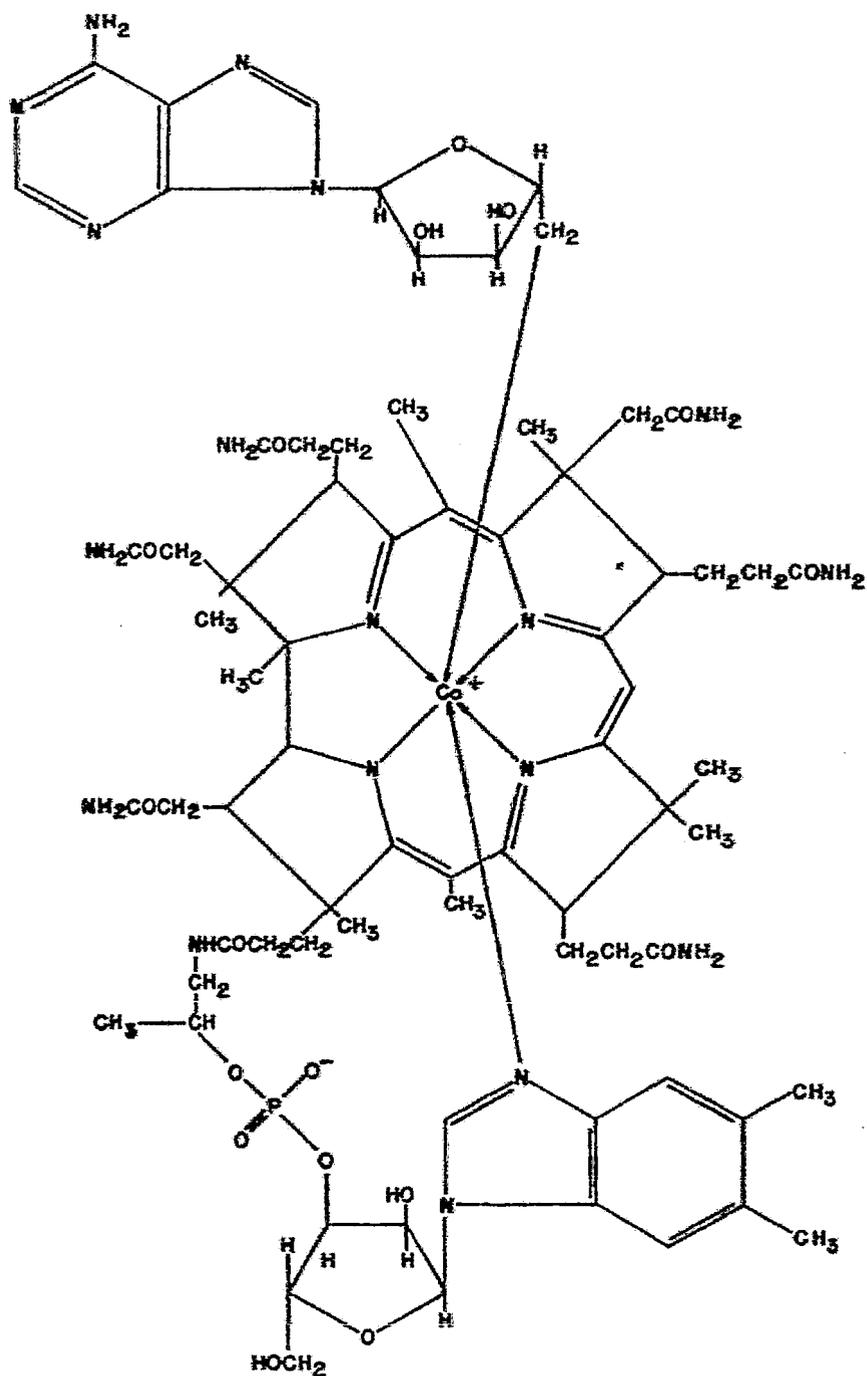


FIGURA No.- II FORMULA DE LA COBAMAMIDA

Material :

Celda de filtración molecular Millipore
Matraz balón de fondo plano de 6 litros de capacidad
Manguera de hule de diámetro interno 8.50 mm y 15.65 mm
de diámetro externo
Tapones de hule del número adecuado
Membrana Millipore de LNPM de 10 000
Olla de presión Sartorius de 20 litros de capacidad
Cilindro de nitrógeno
Manómetros de 4 Kg de capacidad
Tubos de vidrio formando una T, con diámetro interno de
9.40 mm y un diámetro externo de 11.40 mm
Mangueras de conexión rápida Sartorius
Manguera resistente a altas presiones marca tygon
Vasos de acero inoxidable de 6 litros de capacidad
Jeringas hipodérmicas de 1 y 10 ml de capacidad

Sustancias utilizadas :

Gobamamida
Agua libre de pirógenos
Solución fenolada al 2%
Alcohol etílico de 96°
Mezcla freón-óxido de etileno (80/20%)
Glicerina al 10 %
Lisado de amebocitos de Limulus
Endotoxina de E.coli

Antes de iniciar la prueba, el material de vidrio debe lavarse con mezcla crómica, esterilizarse en horno a 300°C durante 3 horas, el material de hule y los tapones se lavan de manera semejante a la indicada en la prueba de filtración de profundidad.

Se arma el sistema de filtración molecular con una sola membrana(LNPM 10 000), para llevar a cabo una prueba a escala piloto, quedando el sistema como se muestra en la figura 12.

3) Método empleado en la prueba piloto :

Antes de iniciar la prueba debe probarse la integridad de la membrana. Esta prueba se realiza en la forma siguiente, al aplicar una presión de 0.2 a 0.3 Kg/cm^2 debe presentar un burbujeo bajo, cuando se presente un burbujeo alto, la membrana tiene una falla en su integridad, la presión óptima de trabajo es de 0.3 a 2 Kg/cm^2 . Es aconsejable no usar una presión mayor de 7 Kg/cm^2 .

El sistema ya armado se limpia de la forma siguiente.

- 1) Pasar 20 litros de agua libre de pirógenos
- 2) Pasarle 2 litros de solución fenolada al 2%
- 3) Cambiar las mangueras de hule con las cuales se trabajo en las operaciones anteriores por mangueras resistentes a altas presiones(mangueras marca tygon).
- 4) Conectar la manguera que resiste altas presiones, de un cilindro que contiene la mezcla freón-óxido de etileno a la celda de filtración, y llenarla con la mezcla de gases hasta tener una presión de 1 Kg/cm^2 .

- 5) Cerrar las válvulas de salida de la celda para que se quede con el gas a esa presión durante 10 horas.
- 6) Lavar la celda con 20 litros de solución alcohólica al 20 % para eliminar la solución fenolada y la mezcla freón-óxido de etileno.
- 7) Lavar la celda con 20 litros de agua libre de pirógenos.
- 8) Hacer una prueba de ausencia de pirógenos valiéndose del lisado de amebocitos de *Limulus*, tanto para el filtrado como para el retenido. El resultado de esta prueba debe ser negativo para poder continuar con el proceso.

Estando la celda de filtración estéril y libre de pirógenos se prepara la solución con la sustancia a tratar.

En un vaso de acero inoxidable de 6 litros de capacidad, agregar 3 litros de agua libre de pirógenos, adicionar 2 g. de Cobamamida, agitar hasta disolución completa. Vaciar la solución a la olla de presión con ayuda de un embudo y un vaso de acero inoxidable de capacidad adecuada. La solución se pasa por la celda de filtración, donde se formará el retenido y el filtrado, después de haber pasado aproximadamente 2 litros de solución, tomar una muestra tanto del retenido como del filtrado y hacer una prueba para detectar pirógenos, los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Fracción de la solución filtrada	Resultados de la prueba de presencia de pirógenos
Retenido	Positivo
Filtrado	Negativo

Conociendo que en el retenido deben estar los pirógenos y en el filtrado no deben existir éstos, se observa que este método si proporciona una solución (filtrado) libre de pirógenos.

La celda se desmontó y se lavó completamente para repetir la prueba, los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Fracción de la solución filtrada	Resultados de la prueba de presencia pirógenos
Retenido	Positivo
Filtrado	Negativo

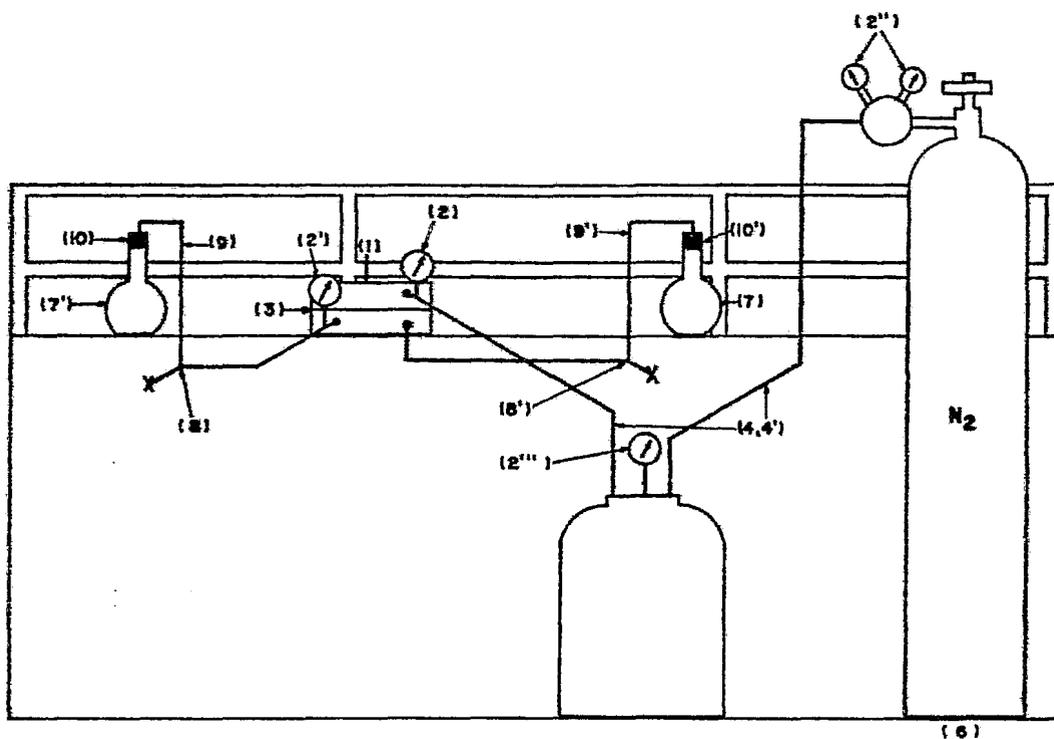


FIGURA No-12

REPRESENTACION DEL SISTEMA DE FILTRACION MOLECULAR UTILIZADO EN LA PRUEBA PILOTO.

- (11) CELDA DE FILTRACION MOLECULAR.
- (2, 2', 2'', 2''') MANOMETROS DE 4 Kg./cm² DE CAPACIDAD.
- (3) MEMBRANA DE FILTRACION MOLECULAR CON LNPM 10,000
- (4, 4') MANGUERAS DE CONEXION RAPIDA SARTORIUS.
- (5) OLLA DE PRESION SARTORIUS.
- (6) CILINDRO DE NITROGENO.
- (7, 7') MATRAZ BALON DE FONDO PLANO DE 6 LITROS DE CAPACIDAD.
- (8, 8') TUBOS DE VIDRIO EN FORMA DE "T".
- (9, 9') MANGUERAS DE HULE.
- (10, 10') TAPONES DE HULE.

Los resultados de la prueba piloto fueron satisfactorios por lo que se preparo todo el material para efectuar el proceso a 4) ESCALA INDUSTRIAL .

Material:

Cilindro de nitrógeno	(1)
4 manómetros de 4 Kg. de capacidad	(2,2')
2 ollas de presión Sartorius de 40 litros de capacidad	(3,3')
Mangueras Sartorius de conexión rápida	(4,4')
2 portafiltros Sartorius formato 293	(5,5')
2 prefiltros Sartorius formato 293	(5,5')
2 membranas filtrantes formato 293; 0.8 micras	(5,5')
2 membranas filtrantes formato 293; 0.45 micras	(5,5')
2 membranas filtrantes formato 293; 0.22 micras	(5,5')
Manguera de hule de diámetro interno 8.50 mm y diámetro externo 15.65 mm	(6,6')
Balanza de 50 Kg de capacidad	(7)
Matraz de 3 litros de capacidad	(8,8')
Celda de filtración molecular Millipore	(9)
Cartucho con membranas de un LMPM de 10 000	(10)
Tubo de vidrio de diámetro interno 9.40 mm y diámetro externo 11.90 mm	(11)
Garrafón de 40 litros de capacidad	(12)
Recipientes de acero inoxidable de 50 litros de capacidad.	
Embudos de acero inoxidable	
Vasos de acero inoxidable de 4 litros de capacidad	
Mangueras resistentes a altas presiones marca Tygon.	

Los números entre parentesis indican las partes correspondientes en la figura 13.

Sustancias utilizadas:

Gobamamida

Agua libre de pirógenos

Alcohol etílico de 96°

Mezcla de gases freón-óxido de etileno (80-20%)

Glicerina al 10 %

Solución fenolada al 2 %

Lisado de amebocitos de Limulus

Endotoxina de E. coli

Método:

Al tener el sistema armado queda como se muestra en la figura 13.

La celda de filtración se limpia como se indica a continuación.

- 1) Pasar 40 litros de agua estéril y libre de pirógenos
- 2) Pasar 20 litros de solución fenolada al 2 %
- 3) Cambiar la manguera de hule con la cual se realizarón las operaciones anteriores por manguera resistente a altas presiones(manguera marca Tygon)
- 4) Conectar la manguera resistente a altas presiones, de la celda de filtración a un cilindro conteniendo freón-óxido de etileno (80-20%)
- 5) Llenar la celda con gas hasta alcanzar una presión de 1 Kg/cm^2

- 6) Cerrar las válvulas de la celda y dejar ésta llena de gas a esa presión durante 10 horas
- 7) Lavar la celda con 40 litros de solución alcohólica(20%)
- 8) Lavar la celda con 40 litros de agua libre de pirógenos
- 9) Hacer una prueba de presencia de pirógenos. Tanto al filtrado como al retenido, los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Fracción de la solución filtrada	Resultado de la prueba de presencia de pirógenos
Retenido	Positivo
Filtrado	Negativo

Al tener el equipo estéril y libre de pirógenos se procede a preparar la solución a tratar.

En un recipiente de acero inoxidable de 50 litros de capacidad, poner 25 litros de agua libre de pirógenos, calentar a 40^o C, adicionar 0.5 Kg. de Cobamamida, agitar mecánicamente hasta disolución completa. Aforar a 36 litros con agua libre de pirógenos, continuar la agitación hasta tener una solución homogénea.

Con ayuda de un embudo y un vaso de acero inoxidable vaciar la solución a la olla de presión, la muestra se pasa por el primer filtro(punto A figura 13) por medio de presión con nitrógeno, esta solución se recibe en una olla de presión(punto B figura 13), pasandola en seguida por la celda de filtración molecular(punto C figura 13)

y luego por un segundo filtro (punto D figura 13), para ser recibida finalmente en el garrafón estéril y libre de pirógenos (punto E figura 13).

Para comprobar la ausencia de pirógenos se tomó una muestra entre el filtro D y el garrafón E (figura 13), se efectuó la prueba de pirógenos usando lisado de amebocitos de *Limulus*, el resultado obtenido fué.

Fracción de la solución filtrada	Resultado de la prueba de presencia de piró- genos
Retenido	Positivo
Filtrado	Negativo

Una vez terminada la filtración, se desconectan los filtros y se lava la celda como se menciono anteriormente, dejandola lista para otra prueba.

La técnica de filtración molecular se repitio por tres ocasiones, la presión utilizada durante la prueba fué, en la olla de presión (3' figura 13) 2 Kg/cm^2 , mientras que la registrada en el manómetro de la celda de filtración molecular 1 Kg/cm^2 (9 figura 13).

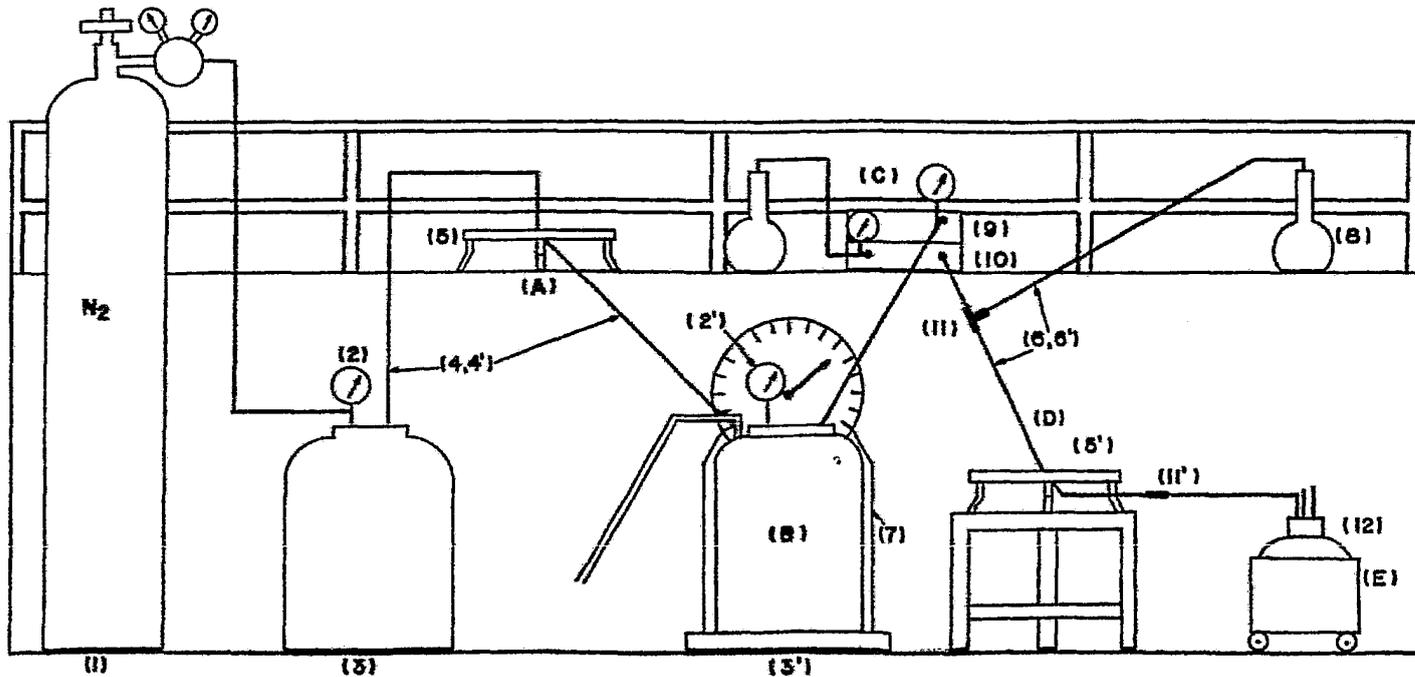


FIGURA No-13

REPRESENTACION DEL PROCESO DE FILTRACION MOLECULAR
A ESCALA INDUSTRIAL.

RESULTADOS:

Los resultados de la prueba de presencia de pirógenos se obtuvieron por dos métodos.

- a) Por reacción térmica en el conejo
- b) Empleando el lisado de amebocitos de *Limulus*

En el cuadro 1 y 2 se incluyen los resultados de la prueba de pirógenos empleando el método de reacción térmica en el conejo.

En el cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos de la prueba de pirógenos utilizando el lisado de amebocitos de *Limulus*.

CUADRO 1

RESULTADO DE LA PRUEBA DE PIROGENOS ANTES DEL PROCESO DE FILTRACION MOLECULAR

REG. DIARIO DE TEMP		PESO Kg	TEMPERATURA		TEMPERATURA		TEMPERATURA		TEMPERATURA		RESULTADO INCREMENTO DE TEMP. °C
1 ^{ER} DIA	2 ^O DIA		INICIAL	HORA	1 ^{ER} HORA	HORA	2 ^{ER} HORA	HORA	3 ^{ER} HORA	HORA	
			TEMP.	HORA	TEMP.	HORA	TEMP.	HORA	TEMP.	HORA	
PRIMERA PRUEBA											
39.4	39.3	2.1	39.3	12.30	39.5	13.30	39.9	14.30	40.0	15.30	0.70°C
39.4	39.3	2.5	39.4	12.30	39.6	13.30	40.0	14.30	39.8	15.30	0.60°C
39.1	39.0	2.0	39.1	12.30	39.4	13.30	39.7	14.30	39.7	15.30	<u>0.60°C</u>
											1.90°C
SEGUNDA PRUEBA											
39.3	39.2	1.7	39.3	12.50	39.7	13.50	39.9	14.50	39.7	15.50	0.60°C
39.3	39.2	2.3	39.3	12.50	39.7	13.50	39.9	14.50	39.7	15.50	0.60°C
39.3	39.2	1.8	39.3	12.50	39.6	13.50	39.9	14.50	39.9	15.50	<u>0.60°C</u>
											1.80°C
TERCERA PRUEBA											
39.1	39.0	2.0	39.1	12.00	39.4	13.00	39.7	14.00	39.7	15.00	0.60°C
39.4	39.3	2.3	39.4	12.00	39.6	13.00	40.0	14.00	39.8	15.00	0.60°C
39.4	39.3	2.4	39.3	12.00	39.5	13.00	39.9	14.00	40.0	15.00	<u>0.70°C</u>
											1.90°C

CUADRO 2

RESULTADO DE LA PRUEBA DE PIROGENOS DESPUES DE FILTRADA Y LIOFILIZADA LA COBAMAMIDA

REG. DIARIO DE TEMP		PESO Kg	TEMPERATURA		TEMPERATURA		TEMPERATURA		TEMPERATURA		RESULTADO INCREMENTO DE TEMP. °C
1 ^{ER} DIA	2o DIA		INICIAL TEMP.	HORA	1 ^a TEMP.	HORA	2 ^a TEMP.	HORA	3 ^a TEMP.	HORA	
PRIMERA PRUEBA											
39.0	39.0	2.3	39.0	10.40	38.8	11.40	38.9	12.40	39.0	13.40	0.00°C
39.0	39.0	2.3	38.9	10.40	39.1	11.40	39.0	12.40	39.0	13.40	0.20°C
39.1	39.1	2.0	39.1	10.40	39.1	11.40	39.2	12.40	39.2	13.40	0.10°C
											0.30°C
SEGUNDA PRUEBA											
39.3	39.3	2.1	39.1	11.40	39.2	12.40	39.2	13.40	39.1	14.40	0.10°C
39.7	39.6	1.7	39.8	11.40	39.8	12.40	39.8	13.40	39.8	14.40	0.00°C
39.0	39.0	2.0	39.0	11.40	39.1	12.40	39.0	13.40	39.1	14.40	0.10°C
											0.20°C
TERCERA PRUEBA											
39.6	39.5	1.9	39.4	10.20	39.4	11.20	39.5	12.20	39.7	13.20	0.30°C
39.5	39.4	1.6	39.6	10.20	39.4	11.20	39.5	12.20	39.5	13.20	0.00°C
39.0	39.0	2.0	39.0	10.20	39.0	11.20	39.1	12.20	39.1	13.20	0.10°C
											0.40°C

CUADRO 3

Resultados de la prueba de presencia de pirógenos empleando el lisado de amebocitos de Limulus.

Resultados de la prueba de pirógenos antes del proceso de filtración molecular.

Pruebas al retenido

Pruebas al filtrado

Primera prueba Positivo

Primera prueba Positivo

Segunda prueba Positivo

Segunda prueba Positivo

Tercera prueba Positivo

Tercera prueba Positivo

Resultados de la prueba de pirógenos después de filtrada y liofilizada la Cobamamida.

Pruebas al retenido

Pruebas al filtrado

Primera prueba Positivo

Primera prueba Negativo

Segunda prueba Positivo

Segunda prueba Negativo

Tercera prueba Positivo

Tercera prueba Negativo

Se consideró importante conocer la variación del flujo de solución filtrada con respecto al tiempo, manteniendo constante la presión, para saber si existía saturación en la parte exterior de la membrana.

Para obtener estos valores se tara la olla de presión, a ésta se le suma el peso de la solución, cada hora se calcula el peso de la solución filtrada, los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Hora	1a Prueba Kg de filtrado	2a Prueba Kg de filtrado	3a Prueba Kg de filtrado
1a Hora	5.5	5.6	5.5
2a Hora	6.0	5.9	5.6
3a Hora	5.5	5.5	5.9
4a Hora	6.4	6.4	7.1
5a Hora	5.9	6.0	6.0
<u>6a Hora</u>	<u>7.2</u>	<u>7.1</u>	<u>6.4</u>
6 Horas	36.5 Kg	36.5 Kg	36.5 Kg

Al revisar los resultados para cada hora, se observan ligeras variaciones entre uno y otro, o sea que no se mantiene constante el flujo de la solución filtrada. Esto es debido a la saturación de la parte exterior de la membrana por las moléculas de alto peso molecular, sin embargo la saturación de la membrana se elimina al abrir la válvula con la cual se permite salir al retenido de la celda de filtración molecular.

RESUMEN:

Dentro de las formas farmacéuticas se encuentran los inyectables, los cuales presentan ciertas ventajas sobre las otras formas farmacéuticas (tabletas, grageas, suspensiones, etc). Por ejemplo, para su administración no es necesario que el paciente este consciente y ejercen más rápidamente su efecto terapéutico, puesto que son administrados directamente al organismo superando sus defensas primarias.

Aunque presentan ciertas desventajas con respecto a las formas farmacéuticas antes mencionadas como por ejemplo, mayor riesgo de contaminación, procesos y áreas de elaboración más sofisticados y como consecuencia más costosos, por lo tanto es necesario un control muy estricto sobre su elaboración, pues se puede presentar una contaminación física, química o bien microbiológica, aunque éstas pueden ser eliminadas siguiendo en forma correcta las BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA.

Los pirógenos son producto del metabolismo de las bacterias, en especial de las bacterias gram negativas.

Como consecuencia de una contaminación microbiológica se encuentran los pirógenos en las soluciones inyectables acuosas.

En el presente trabajo se hace referencia al estudio comparativo de dos métodos para eliminar pirógenos presentes en una materia prima (Cobamamida) utilizada en la elaboración de un inyectable.

La presencia de los pirógenos en las soluciones inyectables acuosas puede ser determinada por cualquiera de los siguientes métodos:

- a) Reacción térmica en el conejo
- b) Empleando el lisado de amebocitos de *Limulus*
- c) Conteo de glóbulos blancos

Una vez determinada la presencia de las endotoxinas e pirógenos en la materia prima debe eliminarse.

En la literatura se encuentran nombrados una serie de métodos que pueden ser empleados, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de las preparaciones en cuestión, ejemplo de estos métodos son:

- a) Filtración de profundidad
- b) Filtración de superficie
- c) Uso de carbón activado
- d) Osmosis inversa
- e) Resinas de intercambio iónico

Otros métodos usados con menor frecuencia son:

- f) Electroósmosis
- g) Radiación gamma
- h) Tratamiento con HCl o NaOH
- i) Ultrasonido
- j) Quelación con polivinilpirrolidona
- k) Tratamiento con peróxido de hidrógeno

Los métodos probados en el estudio son:

- a) Filtración de profundidad
- b) Filtración de superficie o filtración molecular

El método de filtración de profundidad fué probado utilizando una membrana constituida por fibras de asbesto cuyo nombre comercial es EKS 2 , esta placa filtrante, puede mediante un proceso de adsorción eliminar a los pirógenos de la solución filtrada, al emplear este método no se llevo a cabo la eliminación de los pirógenos de la muestra tratada.

El segundo método fué filtración de superficie o filtración molecular, esta técnica lleva a cabo la eliminación de los pirógenos utilizando una celda de filtración la cual se usa con membranas constituidas por polisulfonas, con un tamaño de poro tal que se pueden separar moléculas tan pequeñas como la vitamina B₁₂;

Empleando esta técnica se logró la eliminación de los pirógenos de la muestra tratada.

CONCLUSIONES:

Al realizar las pruebas de presencia de pirógenos con los métodos:

- a) Reacción térmica en el conejo
- b) Empleando el lisado de amebocitos de *Limulus*

Estos presentan una relación entre ambos:

1. Porque cuando la materia prima presenta pirógenos, éstos se pueden detectar por cualquiera de los dos métodos.
2. Cuando ya no existen pirógenos en la materia prima, los dos métodos dan negativos a la prueba de presencia de pirógenos.
3. La técnica de filtración de profundidad aunque está reportada como un método efectivo para la eliminación de los pirógenos, para este estudio en particular no dió resultado, pues los datos de la prueba de presencia de pirógenos así lo demuestran.
4. La técnica de filtración molecular se ha reportado efectiva en la eliminación de pirógenos de las soluciones inyectables; con base a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la técnica de filtración molecular tiene la capacidad de eliminar los pirógenos de la sustancia tratada.
5. La técnica es recomendada para aplicarla en productos que presenten condiciones semejantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 4^o Edición, pag 179-180, México 1974.
- 2) Martin and Cook. Remington's, Practice of Pharmacy, Twelfth Edition, 1961.
- 3) Nowotny, A.M. Molecular Aspects of Endotoxin, reactions; Bact. Rev. 33:72, 1969.
- 4) Ernest Jawetz. Manual de Microbiología Médica. 2^o Edición, pag 185, México 1965.
- 5) Good, G.M. The Biochemistry of Pyrogens. Bull, Parent, Drugs, Assoc. Vol 31, No 3. pag 116-120, 127-135. 1977.
- 6) Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos. 4^o Edición, pag 199-200, México 1974.
- 7) Cooper, J.F: Principles and Applications of de Limulus Test for Pyrogen in Parenteral Drugs; Bull. Parent. Drugs. Assoc. Vol 29 . No 3. pag 122- 130. May-Jun 1975.
- 8) Jose Helman; Farmacotecnia teoría y práctica. la Edición Tomo V. 1980. Cia. Editorial Continental, S.A.
- 9) Levin, J. Bang, F.B: The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation of Limulus Blood; Bull. Johns Hopkins Hosp. 115; 265. 1974.
- 10) Gaffin, S.L: The Clotting of White Cell of Limulus Induced by Endotoxin. Preparation and Characterization of Clot-Forming Proteins. Biorheology, 13; 273. 1976
- 11) Gerba, G.P. et, al: Pyrogen Control by Depth Filtration Pharmaceutical Tecnology. Vol 4. No 6. pag 83-89. 1980.
- 12) Jose Helman; Farmacotecnia teoría y práctica. la Edición. Tomo V. 1980. Cia. Editorial Continental, S.A.

- 13) Frith, C.F., et, al: Water for Injection USP XIX by Reverse Osmosis. Bull. Parent. Drugs. Assoc. Vol 30. No 3. pag 118-127. 1980.
- 14) Koppensteiner, G. Kruger, D. Osmer, K. Pauli, W. Wood, H. and Zimmermann, G ; An Experimental Investigation of Elimination of Pyrogens from Parenteral Medicines; Drugs Made in Germany, Vol 19. pag 113-123. 1976.
- 15) Jose Helman; Farmacotecnia teoría y práctica. la Edición. Tomo V. 1980. Cia. Editorial Continental, S.A.
- 16) Vemuri, S: Principles of Parenteral Products Manufacture. Drugs, Cosmet, Ind; Vol 121. No 1. pag 31-33, 36, 38, 78-80. 1977
- 17) Wood, H: Steril Filtering and Elimination of Pyrogens from Parenteral Medicines with Novel Asbestos-Free Deep-Bed Filter; Drugs Made in Germany. Vol 21. No 2. pag 47-50, 53-54, 56. June 1980.
- 18) Gerba, G.P. et, al: Pyrogen Control by Depth Filtration. Pharmaceutical Technology. Vol 4. No 6. pag 83-89. 1980.
- 19) Fiore, J.V. Babineau, R.A: Filtration an old Process With a New Look. Food. Tech. Vol 33. pag 67-72. 1979
- 20) Rossito, J: A Solution to the Asbestos Problem. Pharm-Tech. Int. Vol 2. pag 39-55. 1979.
- 21) Dwyer, J.L: Fiber Shedding Properties of Depth Filter Media for Steril Filtration. Bull. Parent. Drugs. Assoc. Vol 29. No 5. pag 220-237. 1975.
- 22) Dwyer, J.L: Contaminación de Soluciones Parenterales por Filtros de Asbesto; Bull. Parent. Drugs. Assoc. Vol 29. No 5. 1975.
- 23) Frederiek, H. Meyers: Manual de Farmacologia Clinica. 3a Edición. pag 777. 1977.

- 24) Jose Helman; Farmacotecnia teoría y práctica. la Edición. Tomo V. pag 1384. 1980. CEGSA.
- 25) Frith, C.F. et, al : Water for Injection USP XIX by Osmosis Reverse. Bull. Parent. Drug. Assoc. Vol 30. No 3. pag 118-127. 1976 .
- 26) B. Blazkova; Z.Fovkal, Cesk.Farm., 18,88(1969) a través del Inter. Pharm. Abstr., 6. No 21.816(1969).
- 27) Jose Helman : Farmacotecnia teoría y práctica. la Edición. Tomo lll. pag 886-887. 1980. CEGSA.
- 28) Zimmermann, G: Pyrogens Elimination from Parenteral Medicines by Means of Molecular Filtration. Drugs Made in Germany. Vol 19. pag 123-128. 1976.
- 29) Mc Donald, D.P: Ultrafiltration Joins the Banks of Industrial Separation Processes. Process Engineering. pag 76-77,79. 1973.
- 30) Zimmermann, G: Pyrogen Elimination from Parenteral medicines by Means of Molecular Filtration. Drugs Made in Germany. Vol 19 . 1973 .
- 31) Index Merck. Eighth Edition. pag 314. 1976.
- 32) Glenn, L, Jenkins: Walter, H, Hartung; Química Médica Moderna . 3a Edición. pag 148.
- 33) L.G.Ginger; N.M.Nesset; B.Riegel; E.J.Fietzsimons. J. Am. Pharm. Assoc.Sci. Ed 40. 421(1951).



**Tesis por computadora
único sistema en el país**

Paseo de las Facultades No. 32-C

Ciudad Universitaria

6-58-70-33 6-58-70-44