



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

VALIDACION DE LA PRUEBA DE DETECCION DE  
ENDOTOXINAS BACTERIANAS POR EL METODO DE LISADO  
DE AMEBOSITOS DE LIMULUS (LAL) EN EL PRODUCTO  
PENICILINA G CLEMIZOL: SODICA 4:1 CON  
1000,000 U/FCO.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A :

**ELIZABETH GALAN LABRADA**

ASESOR:

Q.F.B. FRANCISCO JAVIER FLORES RIVERA



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
 FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
 Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Validación de la prueba de detección de Endotoxinas Bacterianas  
por el método de Lisado de Amebositos de Limulus (LAL) en el  
producto Penicilina G Clemizol:Sodica 4:1 con 1000,000 U/fco.

que presenta la pasante: Elizabeth Galán Labrada  
 con número de cuenta: 82559366 para obtener el título de:  
 Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Octubre de 2003

PRESIDENTE	Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas	
VOCAL	M.en C. Marina L. Morales Galicia	
SECRETARIO	Q.F.B. Francisco Javier Flores Rivera	
PRIMER SUPLENTE	M.en FC. Cecilia Hernández Barba	
SEGUNDO SUPLENTE	Q.F.B. Enrique Amador González	

## ***DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS***

*Después de mucho y a pesar de todo...Gracias Dios mío*

*Este objetivo alcanzado tuvo un comienzo y no lo pudiera haber iniciado sin el apoyo incondicional de mis padres.  
"A ustedes papá y mamá, gracias por permitirme ser"*

*A mi amado, querido, adorado,.....etc....."Aquí está..... y ya no estás ....."*

*A mis hijos Yeyé y Nené.: "Espero que este sea un granito que aporte en ustedes el valor del esfuerzo"*

*A mis hermanos: la rebeldía, Martín; la chispa, José Antonio y la ecuanimidad, Andrés...Gracias*

*En esto y muchas cosas más, estuviste, estás y estarás junto a mí...¡ Gracias Tía Reyna !*

*A Eduardo y Angela, por su apoyo incondicional,...Gracias*

*Al Ingeniero Ricardo Peyret García, por su apoyo en el espacio y tiempo necesarios...Gracias*

*A ICN Farmacéutica que me motivó a alcanzar esta meta.*

## 1. INDICE GENERAL

1. Índice General	1
I- Índice de tablas	2
II- Índice de figuras .....	3
III- Abreviaturas.....	3
2. Introducción.....	4
3. Fundamento Teórico.....	7
3.1 Naturaleza de las Endotoxinas-Pirógenos.....	7
3.2 Método de detección de Pirógenos.....	9
3.2.1 Prueba en conejo.....	9
3.2.2 Prueba de Lisado de Amebocitos de <i>Limulus polyphemus</i> .....	12
3.3 Ventajas y desventajas de la prueba de Limulus.....	16
3.4 Validación.....	17
3.5 Información sobre el producto.....	18
3.5.1 Antibiótico.....	18
3.5.2 Penicilinas.....	19
3.6 Penicilina G Clemizol: Sodica 4:1 con 1000,000 U/frasco.....	22
4. Planteamiento del problema.....	24
5. Objetivos.....	25
6. Hipótesis.....	26
7. Equipo y material.....	27

8. Desarrollo experimental.....	29
8.1 Pruebas iniciales.....	31
8.2 Preparación de materiales y soluciones.....	34
8.3 Pruebas preparatorias o preliminares.....	35
8.4 Validación de la prueba.....	38
8.4.1 Sensibilidad del reactivo LAL.....	38
8.4.2 Curva de inhibición.....	43
8.4.3 Curva de compatibilidad.....	46
8.5 Reproducibilidad del método.....	53
9. Conclusiones.....	57
10. Bibliografía.....	59

## I. Índice de Tablas

Tabla 1: Ventajas y desventajas entre las pruebas de LAL vs Conejo ...	16
Tabla 2: Datos teóricos resumidos.....	37
Tabla 3: Resultados de la prueba de sensibilidad del reactivo de LAL.....	42
Tabla 4: Resultados de la prueba de inhibición del producto en concentración $4\lambda$ .....	45
Tabla 5: Resultados de la prueba de inhibición del producto en concentración $2\lambda$ .....	45
Tabla 6: Resultados del producto lote 8H4071 .....	50
Tabla 7: Resultados del producto lote 8F4034 .....	50
Tabla 8: Resultados del producto lote 8H4068 .....	51
Tabla 9: Resultados de la curva blanco .....	51
Tabla 10: Resultados del producto lote 8H4071 (2° analista) .....	53
Tabla 11: Resultados del producto lote 8F4034 (2° analista) .....	54
Tabla 12: Resultados del producto lote 8H4068 (2° analista) .....	54

Tabla 13 Resultados de la curva blanco .....	54
Tabla 14: Resultados 1° analista con la prueba oficial .....	55
Tabla 15: Resultados comparativos entre el 1° y 2° analista con la prueba de LAL .....	56

## II- Índice de Figuras

Figura 1: Representación esquemática de la estructura de un lipopolisacarido .....	8
Figura 2: Diagrama en la detección de endotoxinas bacterianas.....	13
Figura 3: Secuencia de reacción método tapón de gel .....	15
Figura 4: Estructura básica de la penicilina G .....	21
Figura 5: Diagrama de la metodología empleada en la determinación de endotoxinas bacterianas (tapón de gel) .....	30

## III. Abreviaturas

U	Unidad Biológica
BPF's	Buenas Prácticas de Fabricación
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
LAL	Lisado de Amebocitos de Limullus
Fco.	Frasco
°C	Grados Celsius
g	Gramos
USP	United States Pharmaceutical
Kg	Kilogramo
UE ó EU	Unidad de Endotoxina
EU/ mL	Unidad de Endotoxina / mililitro
FDA	Food and Drug Administration

## 2. INTRODUCCIÓN<sub>(1,14)</sub>

La validación de procesos es un requisito de las Buenas Prácticas de Fabricación (Good Manufacturing Practices) para productos farmacéuticos terminados; es un proceso que puede reducir la dependencia de análisis completos a productos en proceso o terminados, existiendo un ahorro económico de material, reactivos y mano de obra.

El criterio para validar un método analítico depende de las necesidades de cada laboratorio, de las aplicaciones que tenga el método, los requerimientos oficiales y sobre todo dependerá de la experiencia y criterio farmacéutico.

Dentro de los productos farmacéuticos que se consideran críticos por la complejidad en su control y fabricación, están los productos parenterales.

Los productos farmacéuticos estériles parenterales, deben poseer características únicas, tales como encontrarse libres de microorganismos, pirógenos, partículas y cualquier otra sustancia que presente toxicidad potencial para el paciente; en otras palabras, los patrones de calidad de estos productos son extremadamente altos. Por tal motivo, los métodos empleados en la detección de algunos contaminantes, como lo son las sustancias pirogénicas, se consideran, un factor crítico en su fabricación, su presencia puede producir fiebre, shock anafiláctico y en ocasiones hasta la muerte.<sub>(5,6)</sub>

La prueba de pirógenos en materia prima y producto terminado se ha venido realizando en conejo desde 1942, considerándose la prueba oficial en la Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos, para detección de pirógenos en materias primas y producto terminado.

Actualmente se tiene la posibilidad de sustituir esta prueba por el método LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus), realizando la validación de esta técnica para que los resultados sean aprobados por la Secretaria de Salud en el caso de que la monografía particular no lo avale.

El lisado de amebocitos de limulus, es un extracto acuoso de células de la sangre (amebocitos) del cangrejo herradura, *limulus polyphemus*.

Howell, describió la coagulación de la sangre del *limulus polyphemus* en 1885; en los años 50 en el Marine Biological Laboratory, Hole y Bang, descubrieron que las bacterias Gram negativas causan la coagulación en su sangre.

Levin y Bang, mas tarde determinaron que la reacción que se llevaba acabo es de tipo enzimática, y que las enzimas se encuentran dentro de gránulos en los amebocitos.<sup>(1)</sup>

La prueba de LAL es una prueba in vitro, que detecta y cuantifica endotoxinas pirogénicas, basándose en la capacidad que tiene de reaccionar con la endotoxina para dar lugar a la formación de un gel. Con la prueba de endotoxina bacteriana se estima que concentración de endotoxina puede estar presente en una muestra parenteral.

Los métodos más empleados son: método turbidimétrico, método cromogénico y el método de formación de gel.

El método LAL es más sensible, específico, simple, barato y reproducible en comparación con la prueba oficial en conejos. Esta prueba se lleva a cabo mezclando en partes iguales el reactivo LAL y la muestra en estudio, donde el reactivo LAL en presencia de pirógenos (Endotoxinas Bacterianas) da una reacción enzimática, formando un coágulo opalescente y firme.

Actualmente, el realizar este estudio no solo radica en reducir costos, obtener beneficios y mejorar el Control de la Calidad del análisis de estos productos, sino también, cumplir con las regulaciones de la Secretaría de Salud y la FDA optimizando el sistema de análisis.

Otros de los beneficios que tiene la prueba de LAL, son: es más sensible, se requiere menor cantidad de muestra para la prueba y el tiempo de respuesta es menor. En la prueba con conejos se necesitan 3.5 h de análisis como mínimo, mientras que con la de LAL, en una hora se obtienen resultados. (1,3)

En el presente trabajo, se demuestra la inhibición-compatibilidad, confiabilidad y reproducibilidad de la prueba de pirógenos por el método LAL, como una buena sustitución de la prueba oficial en conejos, realizándolo en el producto Betalactámico, Penicilina G Clemizol:Sódica 4:1 con 1,000,000U/fco.

### **3. FUNDAMENTO TEÓRICO**

#### **3.1 Endotoxinas Bacterianas-Pirógenos <sup>(1)</sup>**

El término pirógeno, se empleó para describir este contaminante, como el principal y el más potente de efecto biológico, capaz de producir fiebre, shock y hasta la muerte, dependiendo de la concentración a la que se encuentre en el torrente sanguíneo.

Las endotoxinas bacterianas son estables a temperaturas elevadas y están asociadas a las bacterias Gram negativas, quienes se encuentran en todas partes, aire, agua, materias primas, etcétera, siendo difíciles de eliminar, y en la Industria Farmacéutica constituyen un grave problema.

Existe otro tipo de agentes que son capaces de producir fiebre tales como: sustancias químicas y partículas de polvo, que en la Industria Farmacéutica pueden ser controladas durante un proceso de fabricación por medio de las Buenas Prácticas de Fabricación.

##### **3.1.1 Naturaleza de las Endotoxinas-Pirógenos**

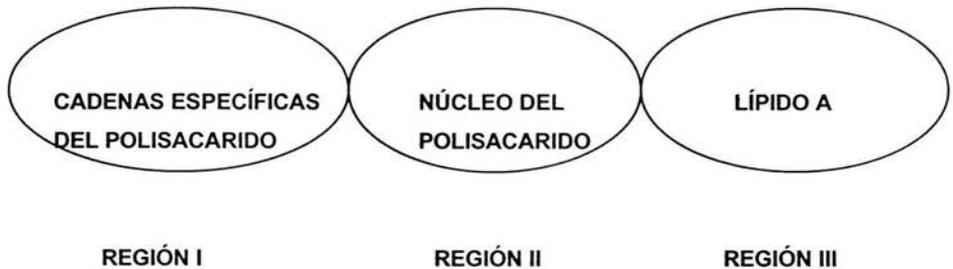
En su estado natural las endotoxinas bacterianas son Lipopolisacáridos complejos (proteínas y carbohidratos) procedente de la capa más externa de la pared celular de las bacterias Gram negativas, estos componentes son liberados al medio cuando se mueren o se lisan estas bacterias y están

caracterizados por poseer carga negativa y alto peso molecular (aproximadamente 1,000,000 daltons).<sup>(1,2)</sup>

Las endotoxinas aisladas de la membrana externa de las bacterias poseen tres regiones:

- ✓ La región más interna (III): llamada lípido A siendo la responsable de la pirogenicidad.
- ✓ La región intermedia (II): llamada núcleo y que está formada en conjunto con el lípido A.
- ✓ La región externa (I): llamada cadena "O" específica, siendo la responsable de la inmunoespecificidad de la endotoxina.

Una representación esquemática de estas endotoxinas se aprecia en la figura 1



**Figura 1: Representación Esquemática de la estructura de un LIPOPOLISACARIDO<sup>(2)</sup>**

Las endotoxinas bacterianas pueden ser inactivas cuando se destruye la molécula del lipopolisacárido, es decir cuando los microorganismos se autolisan o se fragmentan por métodos mecánicos o químicos.

Algunos métodos para inactivación pueden ser, el calor, generalmente se destruyen esterilizando por vía seca a 250 °C durante 30 minutos, también usando ácidos o bases diluidas, sustancias oxidantes y por radiaciones.

### **3.2 Métodos de detección de pirógenos<sup>(5,6)</sup>**

Los métodos para detectar pirógenos son dos:

- ✓ Prueba en conejos
- ✓ Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL)

A continuación se describen en detalle:

#### **3.2.1 Prueba en Conejos <sup>(1)</sup>**

En los inicios del uso de productos parenterales y terapias intravenosas (años 1920s), Florencia Seibert, observó que enseguida de la aplicación de estos productos, se presentaba fiebre y otros efectos secundarios peligrosos. Lo cual indicaba que se debía a la presencia de sustancias que provenían de microorganismos. Ante esto, demostró la necesidad de usar agua libre de estas sustancias para la fabricación de productos parenterales e implementó el sistema de la prueba para la detección de pirógenos en conejos, que consiste en registrar las variaciones de temperatura que siguen a la inyección intravenosa de soluciones de prueba en conejos

La prueba en conejo, es una prueba *in vivo* la cual se basa en la capacidad que tienen los conejos para desencadenar una respuesta febril cuando existe la presencia de agentes pirogénicos principalmente endotoxinas.

Los Conejos de prueba deben ser preferentemente de la misma variedad, mismo sexo, adultos jóvenes, sanos, de un peso no menor a 1,500g.

Además de que hayan sido alimentados con una dieta balanceada libre de antibióticos durante la semana anterior a la prueba. Los animales deben mantenerse alojados en jaulas individuales en un local con temperatura ambiente uniforme, de 20 a 23 °C, con una variación de más o menos 3 °C, de la seleccionada, sin ruido o factores que exciten a los animales.

Antes de usar los animales por primera vez, o cuando no se han usado durante dos semanas, se debe controlar su temperatura durante 3 días consecutivos. Antes de la prueba es necesario tomar la temperatura vía rectal (temperatura testigo), y dejar reposar 30 minutos al animal para proceder a la inyección del producto.

A partir de la temperatura testigo para cada conejo, se calcula los incrementos obtenidos después de la inyección. Cuando se presente una disminución de temperatura, se considera un incremento cero. Si ningún conejo muestra un incremento individual de 0.6 °C o más, sobre su temperatura testigo respectiva, y si la suma del incremento mayor de los tres conejos no excede de 1.4 °C, la muestra cumple con los requisitos para ausencia de pirógenos.

Si uno de los animales muestran un aumento de temperatura de 0.6 °C o más o si la suma del incremento de los tres conejos excede de 1.4 °C, repetir la prueba usando 5 conejos. Si no más de tres de los ocho animales muestran una elevación de temperatura de 0.6 °C o más y si la suma de los incrementos mayores de los ocho conejos no es superior a 3.7 °C la muestra cumple con los requisitos para ausencia de pirógenos.

Después de usar los especímenes para una prueba de pirógenos, deberá transcurrir un periodo no menor de 48 horas antes de volverlos a usar si la prueba fue negativa, y de dos semanas si el conejo presenta un incremento de la temperatura de 0.6 °C o más o si estuvo involucrado en una prueba positiva.

Todo el material, tanto de vidrio como agujas y jeringas, debe estar libre de pirógenos para lo cual se esterilizan con calor seco a 250 °C por lo menos durante 30 minutos, o por otro método que proporcione resultados satisfactorios.

En 1942 este método es adoptado por la United States Pharmacopeia (USP) como método oficial y confiable para determinar la concentración pirogénica. Por muchos años este método ha demostrado ser eficaz, pero posee algunas desventajas y limitaciones como la necesidad de tener un biotério con cierto número de conejos bajo condiciones específicas de alimentación, temperatura, humedad, contar con veterinario para el cuidado y manejo del mismo, lo cual implica un costo elevado; además del tiempo prolongado para realizar la prueba, ya que para poder dar un resultado se necesita un tiempo mínimo de 3.5 horas. Finalmente, esta prueba tiene la limitación en la detección de la presencia de un pirógeno, ya que en concentraciones pequeñas de estos contaminantes, muchas veces los animales no responden.

### 3.2.2 Prueba de Lisado de Amebocitos de *Limulus polyphemus* (LAL)<sup>(1,2,20,21,22)</sup>

La prueba LAL, ha sido reconocida como el método más conveniente para detectar endotoxinas bacterianas comúnmente conocidas como pirógenos.

Es una prueba *in vitro*, que detecta la endotoxina pirogénica y que se basa en la capacidad, que tienen el lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*, de reaccionar con la endotoxina para dar lugar a la formación de un gel.

Los cangrejos cacerola (*Limulus polyphemus*) son fósiles vivientes desde hace aproximadamente 300 millones de años, éstos son encontrados en aguas de los Estados Unidos de Norteamérica. Los grandes ejemplares se establecen en las costas del Atlántico, siendo las hembras mucho más largas que los machos, las especies que se utilizan para este fin, son recolectadas a una profundidad de 30 a 40 pies cerca de Chicoteagur, Virginia.

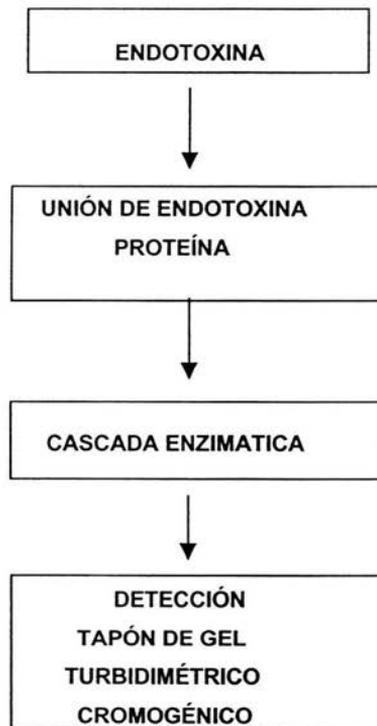
En 1902 Loeb, describe una enfermedad en los "Cangrejos Cacerola", que consiste en la coagulación intravascular que trae como consecuencia la muerte del animal.

En 1954 Bang junto con Levine, descubrieron que la etiología de dicha enfermedad se debía a la presencia de endotoxinas, para 1956 se inició el estudio a fondo de esta enfermedad. Doce años después llegaron a la conclusión de que había una reacción de gelificación de tipo enzimático que

se lleva a cabo entre las proteínas coagulables de los amebocitos circulantes del cangrejo y la existencia de endotoxinas.

Con la prueba de endotoxina bacteriana, se estima que concentración de endotoxina puede estar presente en una muestra parenteral. Los métodos mas empleados son el método de tapón de gel, método turbidimétrico y método cromogénico.

A continuación se muestra la secuencia que se sigue en la reacción que se lleva a cabo por el método de endotoxinas bacterianas:



**FIGURA 2: DIAGRAMA EN LA DETECCIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS<sub>(2)</sub>**

En la Industria Farmacéutica, es posible realizar la detección de endotoxinas Bacterianas por cualquiera de los 3 métodos que a continuación se mencionan:

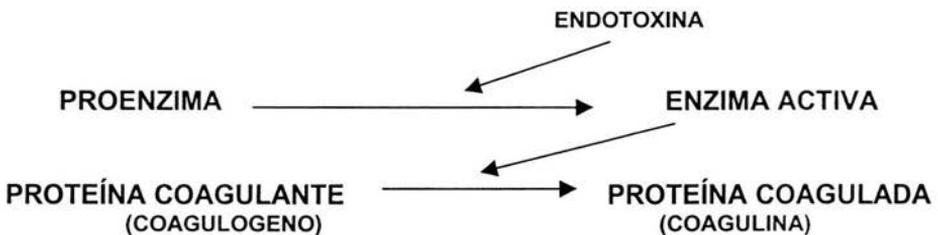
El método Turbidimétrico, es un método de cuantificación, que va detectando diferentes concentraciones de endotoxinas siguiendo una cinética turbidimétrica, esta técnica se realiza en un equipo diseñado especialmente (LAL-5000), también se conoce como la técnica del microplato, se corre una curva estándar donde se mide la densidad óptica (espectrofotometría) contra el tiempo y solo necesita 0.1 mL de reactivo y 0.4 mL de muestra, detecta desde 0.1-1.0 EU/mL.

El método Cromogénico es similar al turbidimétrico, pero en esta técnica el desarrollo de color se monitorea, la detección de este método es de 0.005 EU/mL. A la mezcla de reacción se le adiciona un sustrato sintético, existiendo un desarrollo de color amarillo que es medido en un espectrofotómetro.

Por último, el método de tapón del gel, se forma mediante una reacción enzimática, donde la enzima se activa (coagulasa), hidrolizando los enlaces específicos de la proteína presente a través del Lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus* (coagulógeno), dando resultado a la coagulina, que forma una pasta gelatinosa que indica la presencia de endotoxinas en los productos. Este método en la actualidad es el más utilizado por ser menos costoso y es el que se describirá a continuación.

## SECUENCIA DE REACCIÓN EN EL MÉTODO DE TAPÓN DE GEL

Todo este proceso se inicia cuando la enzima procoagulante (proenzima) es activada en presencia de la endotoxina bacteriana. Cuando la enzima activa se encuentra en contacto con la proteína coagulante (coagulogeno) se forma el tapón de gel o proteína coagulada (coagulina) .



**FIGURA 3: SECUENCIA DE REACCIÓN MÉTODO TAPÓN DE GEL<sub>(2,18,20)</sub>**

- ✓ Proenzima, es la fracción de peso molecular alto y sensible al calor.
- ✓ Coagulogeno, es un polipéptido compuesto por aproximadamente 215 residuos de aminoácidos con un peso molecular de entre 19000 a 25000 daltons.
- ✓ Coagulina, son proteínas con aproximadamente 145 residuos de aminoácidos que forman las fibras con un diámetro de 50 a 100 micras

Para que la reacción se realice, es importante hacer notar que se necesita la presencia de iones divalentes como  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$ , los cuales son necesarios en la activación de la proenzima, y por lo tanto en la actividad enzimática subsecuente.

### 3.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE LIMULUS <sup>(2,5)</sup>

A continuación se citan algunas de las ventajas y desventajas que tiene la prueba de LAL en comparación con la prueba tradicional en conejos:

	<b>PRUEBA DE LIMULUS</b>	<b>PRUEBA DE CONEJOS</b>
<b>SENSIBILIDAD</b>	Detecta desde 0.03 EU/mL	Detecta desde 10 EU/mL
<b>TIEMPO DE ANÁLISIS</b>	1.0 horas de análisis	3.5 horas de análisis
<b>VALORACIONES BIOLÓGICAS</b>	El reactivo estandarizado elimina las variaciones	Puede haber variaciones biológicas
<b>PRODUCTOS TOXICOS</b>	Puede usarse para productos tóxicos	No puede ser probado en productos tóxicos
<b>ANÁLISIS DE PIRÓGENOS EN SANGRE SUERO Y PLASMA</b>	No se puede detectar	Si se detecta
<b>COMPATIBILIDAD</b>	No es compatible para todos los productos	Si es compatible
	No es sensible a otro tipo de partículas como polvo y pelusas, solo para endotoxinas	Si es sensible a otro tipo de partículas

**TABLA 1: VENTAJAS Y DESVENTAJAS ENTRE PRUEBA DE: LAL vs CONEJOS**

### **3.4 VALIDACIÓN<sub>(13)</sub>**

La validación de métodos analíticos, ha adquirido gran importancia en la industria Farmacéutica, debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos analíticos apropiados.

Se puede establecer que la validación de métodos analíticos es la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones y los atributos de calidad establecidos.

La validación es uno de los objetos de las normas de BPF's y también es un objetivo de la Secretaria de Salud; en México es ya un requisito reglamentado por esta entidad.

En 1980 la United States Food and Drugs Administration (FDA) anunció la disponibilidad de una guía preliminar que exponía procedimientos para utilizar la prueba LAL como método de análisis para determinar endotoxinas en productos terminados para medicamentos parenterales tanto en humanos como en animales.

En 1985 la United States Pharmacopeia (USP XXI) incluye la prueba LAL como un método que sirve para estimar la concentración de endotoxinas bacterianas, menciona la necesidad de validar la prueba antes de ser utilizada como método de rutina, sustituto de la prueba de conejo.

En diciembre de 1987, la United States Food and Drugs Administration (FDA), publicó la guía de validación de la prueba de LAL como análisis de endotoxinas en productos terminados para medicamentos de aplicación parenteral y equipo médico, solicitando que en estudios de validación se demuestre la inhibición-compatibilidad, confiabilidad y reproducibilidad de los productos que quieran ser sometidos a la prueba y es esto precisamente lo que sé esta llevando acabo en estos momentos en la Industria Farmacéutica.

A la fecha, la FDA ha ido mejorando la prueba y aceptado los límites de endotoxina en las monografías individuales descritas en la USP para varios preparados farmacéuticos, incluyendo agua y radiofarmacéuticos.<sup>(18)</sup>

### **3.5 INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO**

#### **3.5.1 Antibiótico** <sup>(12,16,21)</sup>

Son sustancias químicas producidas por organismos vivientes, capaces de inhibir en pequeñas cantidades los procesos vitales de ciertos microorganismos, destruyendo e impidiendo su desarrollo y reproducción.

Literalmente la palabra "antibiótico" significa cualquier sustancia antagonista de la vida.

El primer registro científico de actividad antibiótica fue realizado por Luis Pasteur en 1877.

Sir Alexander Fleming observó en 1928, la inhibición de las bacterias por una colonia de *Penicillium notatum* que se había desarrollado como contaminante sobre una caja petri. Fleming abogó en su publicación por el posible uso clínico de la sustancia formada en el cultivo de *Penicillium*.

En general los antibióticos son sustancias químicas diversas, complejas, de gran peso molecular, cuya síntesis suele ser muy dificultosa, y en algunos casos antieconómica en comparación con su obtención por los medios naturales.

La adición de varios radicales químicos a la estructura molecular de los antibióticos da lugar a sustancias de mayor solubilidad, de menor toxicidad y mayor actividad, y la alteración de la molécula ha producido algunas sustancias antibióticas presumiblemente no conocidas en la naturaleza.

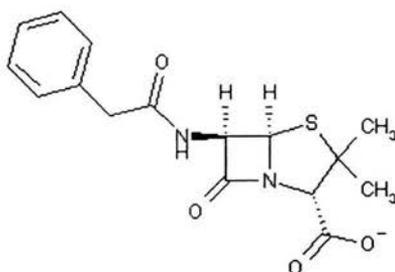
### **3.5.2. Penicilinas**<sup>(12,16,17,21)</sup>

Es una sustancia antibiótica producida por los hongos *Penicillium notatum* y *P. chrysogenum* de la familia *Aspergillaceas*. Es un hongo de color verde azulado que posee delgadas hifas sumergidas y también aéreas tabicadas de las cuáles arrancan conidióforos ramificados.

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

La penicilina G se encuentra clasificada como una penicilina natural, comercialmente no se encuentra en forma natural sino como sales de penicilina, siendo está la materia prima para la elaboración de la gran diversidad de marcas de antibióticos que se consume a nivel nacional.

A continuación se muestra la estructura básica de la Penicilina G



**FIGURA 4: ESTRUCTURA BÁSICA DE LA PENICILINA G<sub>(17,21)</sub>**

La Penicilina G o bencil penicilina se puede combinar con el sodio, potasio, calcio y la Procaína para formar los compuestos:

Penicilina G sódica, G potásica, G cálcica y Penicilina G Procaína, que es de acción prolongada.

La penicilina que más abunda en el comercio es la penicilina G Potásica o bencil Penicilina Potásica. Se presenta como un polvo cristalino blanco

inodoro, muy soluble en agua, también en alcohol y glicerina, insoluble en éter y cloroformo. Se destruye por acción del calor, por ácidos, álcalis y agentes oxidantes y fermentos bacterianos.

Las sales de Penicilina que se fabrican actualmente permiten conservarlas en estado sólido sin necesidad de refrigeración.

La Penicilina inhibe el desarrollo y reproducción de los gérmenes o provoca su destrucción según la dosis y su tiempo de contacto.

La penicilina es particularmente activa contra bacterias gram positivas en especial en infecciones producidas por estafilococos, estreptococos, neumococos, algunos clostridium y lactobacillus.

### 3.6 PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 CON 1,000,000 U/frasco.

#### COMPOSICION

CLEMIZOL BENCILPENICILINA	800,000 U
BENCILPENICILINA SODICA CRISTALINA	200,000 U

Este producto inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana ejerciendo una acción bactericida sobre los microorganismos sensibles, su espectro de actividad lo ejerce con efectividad contra la mayoría de los cocos grampositivos, como estafilococos no productores de penicilinasas, estreptococos de los grupos A,B,C,G,H,L, y M y neumococos, Neisseria gonorrhoeae, Treponema pallidum, Corynebacterium diphtheriae, Bacillus anthracis, Clostridium, Actinomyces bovis, Streptobacillus moniliformis y Listeria leptospira. La penicilina G Clemizol tiene propiedades antihistamínicas con efecto prolongado, la penicilina G sódica cristalina se absorbe rápidamente, alcanzando concentraciones séricas máximas entre 15 y 20 minutos después de su administración intramuscular. La penicilina G clemizol se libera lentamente del sitio de aplicación originando niveles séricos constantes de penicilina G durante 12 a 24 horas. Aproximadamente el 60% de la penicilina G se une a proteínas plasmáticas, distribuyéndose ampliamente por todos los tejidos y se elimina por secreción tubular.

Existe evidencia de laboratorio de alergia cruzada parcial entre esta penicilina y otros antibióticos betalactámicos como: ampicilina, amoxicilina y carbenicilina. Al igual que otros betalactámicos, pueden presentarse

reacciones hipersensibilidades o alergias, urticaria, dermatitis exfoliativa, broncoespasmo.

**Usos:** Amigdalitis, erisipela, escarlatina, infecciones de las vías respiratorias superiores, piel y tejidos blandos, neumonía y bronconeumonía, angina de Vincent, sífilis y gonorrea. Este medicamento es adecuado para la erradicación del estreptococos betahemolítico en el tratamiento y prevención de la fiebre reumática.

**Dosis:** Por vía intramuscular un frasco cada 12 ó 24 horas durante 10 días.

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La necesidad de implementar el método de tapón de gel para la detección de endotoxinas bacterianas en el producto Penicilina G Clemizol:Sodica 4:1 con 1,000,000 U/frasco es basado en los siguientes puntos:

Mejorar la confiabilidad de la prueba de pirógenos. Mientras que en el método de conejo se tiene sensibilidad de detectar 10 unidades de endotoxina, en el método de tapón de gel se puede detectar 0.03 unidades de endotoxinas, lo cual se ve reflejado en la calidad del producto.

Proponer un beneficio en el costo de la prueba, en el método de conejo es necesario contar con instalaciones, animales y cuidados especiales, además de que la prueba requiere de mayor tiempo en su realización, todos estos inconvenientes el método de LAL no los tiene ya que por ser una prueba in vitro se puede realizar en el laboratorio y el tiempo de su realización es 3 veces menos, esto representa un beneficio económico en la manufactura del producto terminado.

Cumplir con las regulaciones vigentes, el método de LAL es el que se esta adoptando en la actualidad para la prueba de pirógenos en la Industria Farmacéutica.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. GENERALES**

Establecer de manera experimental, que la prueba de pirogenos por el método de LAL (tapón de gel) para el producto parenteral PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ frasco, es compatible, confiable y reproducible para poder sustituir a la prueba oficial de detección de pirógenos en conejo.

### **5.2. PARTICULARES**

5.2.1 Establecer la mínima concentración de validación permitida (M.V.C.) y la máxima dilución valida permitida (M.D.V.) para el producto PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ frasco

5.2.2 Calificar a las instalaciones, equipos e instrumentos del laboratorio utilizados en la prueba, además del personal que efectuó la prueba de LAL (tapón de gel)

5.2.3 Comprobar el costo beneficio que puede tener el uso del método de LAL en la prueba de pirógenos.

## 6. HIPÓTESIS

Si se demuestras la validación, de la prueba de pirógenos por el método de LAL (tapón de gel) en el producto parenteral PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ frasco conforme lo solicita la FDA, se puede sustituir el método tradicional por conejo

## 7. EQUIPO Y MATERIAL

### 7.1. Material Diverso:

- ✓ Pipetas de vidrio de 1, 5 y 10 mL
- ✓ Micropipeta automática de 20 µL
- ✓ Frascos vial de 25 mL despirogenizado
- ✓ Matraz erlenmeyer de 125 mL despirogenizados
- ✓ Pipetas de 5 mL despirogenizadas
- ✓ Gradillas de plástico para tubos de 10 x 75 mm
- ✓ Tubos para prueba de LAL de 10 x 75 mm
- ✓ 1 termómetro de inmersión parcial de -20-100° C
- ✓ 1 marcador de tinta permanente
- ✓ Uniforme de trabajo
- ✓ Guantes
- ✓ Cofia
- ✓ Cubrebocas

### 7.2 Reactivos Biológicos

ENDOTOXINA      Associetaes of Cape Cod Inc.  
Control STD Endotoxin  
E. Coli 0113:H10  
Lote: 73  
Fecha de caducidad 8/02  
Potencia 0.5 mcg/vial

#### REACTIVO LAL PYROTELL

Lote: 298-01-046  
Sensibilidad de marbete 0.06 UE/mL  
Fecha de caducidad: 1/03

AGUA            Agua inyectable Apirogenica  
                    Ampolleta con 5mL  
                    Lote # 8G2408

### **7.3 Reactivos Químicos**

Tris Hidroximetil Amino-Metano (THMAM)

Sal buffer estandarizada 99.8 %

Grado reactivo

Lote # 480R

Solución Buffer de Tris Hidroximetil amino-metano pH 7.5

Acido clorhídrico 0.1 N

### **7.4 Equipo.**

Agitador vortex Maxi-Mix II Thermolyne

Potenciómetro Beckman  $\phi$  45 meter

Incubador BG

Horno Geo Lab

Termómetro de inmersión parcial 76 MM IMM

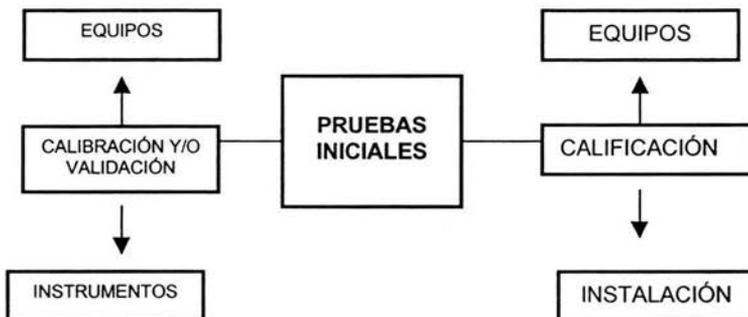
Campana de Flujo Laminar

## 8. DESARROLLO EXPERIMENTAL<sub>(2,5,6,11,18,19,21,22)</sub>

En el Laboratorio Farmacéutico ICN<sup>®</sup>, se realizó el análisis de pirógenos por el método Endotoxinas Bacterianas "in vitro" con el Lisado de Amebocitos de *Limulus polyphemus* (tapón de gel) para el producto parenteral PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ frasco .

### DIAGRAMA DE FLUJO

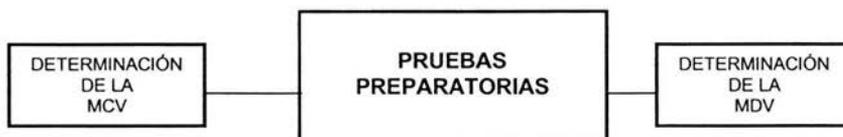
I.-



II.-



III.-



IV.-



V.-



**FIGURA 5: DIAGRAMA DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA DETERMINACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS (TAPÓN DE GEL)**

## **8.1 PRUEBAS INICIALES**

### **Calificación de Instalaciones y equipos.**

Para la Industria Farmacéutica, el termino calificación se refiere a la evaluación de las características de los elementos del proceso. En la actualidad las regulaciones Sanitarias Vigentes y las Buenas Prácticas de Fabricación exigen comprobar que las instalaciones y/o equipos cumplen para lo que fueron diseñadas, siendo sus operaciones conforme especificaciones y su función la propia para dar resultados de calidad, por lo que es necesario llevar a cabo las siguientes calificaciones:

Calificación de Instalación, aquí se determina si la instalación y/o equipo cumple con su diseño, para nuestro caso, se revisaron los servicios existente y sus condiciones; la existencia de procedimientos de uso, manuales, planos, bitácoras de uso y programa de mantenimiento; así como los materiales que conforman la instalación y/o equipo.

Calificación de Operación, en esta fase se desarrolla un programa de pruebas donde se compruebo si la instalación y/o equipo cumplen con su operación según su especificación. En la campana de flujo laminar se revisaron los motores, interruptores, teclas del panel, alarmas e instrumentos de medición, cumpliendo con su operación.

En el caso la instalación por ser un área aséptica, se revisa la unidad manejada de aire, como elemento importante en la calidad de aire, se cumple con su especificación.

Calificación de Desempeño, es aquí donde se demuestra si la campana de flujo laminar y la instalación como área aséptica, proporcionan la calidad de aire necesarias para las tareas que ahí se realizan. Para el cumplimiento de esta fase se realizó lo siguiente: la clasificación del área, conteo de partículas no viables en filtros, velocidad de flujo de aire en filtros, presión diferencial, cambios de aire por hora, inspección de áreas, conteo de partículas viables, temperatura y humedad relativa existente.

Las calificaciones descritas anteriormente, son realizadas por terceros autorizados, quienes documentan las pruebas en un reporte.

El área donde se realizaron las pruebas fue el área aséptica de siembras para productos no estériles de Control Biológico con ayuda de la campana de flujo laminar, flujo vertical, CC-018 de dicho sector.

### **Calificación de Personal.**

Así como las regulaciones Oficiales vigentes solicitan que las instalaciones y/o equipos en la Industria Farmacéutica sean calificadas, el personal debe de cumplir con obligaciones y responsabilidades que lo llevan a tener una capacitación especializada.

Para fines de la prueba de LAL en él estudio de este trabajo se realizó en dos analistas de la siguiente manera:

La calificación para el 1° analista ( en este caso soy Yo) se realizó conociendo y estudiando de inicio la guía de la FDA de validación de la prueba de LAL como análisis de endotoxinas en producto terminado y

equipo medico, preparando un protocolo de análisis previo, donde se establece como será mi calificación.

La calificación se llevo acabo en las instalaciones de los laboratorios MALLINCKRODT MEDICAL, bajo la supervisión del personal de Microbiología. Esta consistió en la comprobación de la sensibilidad de un reactivo de LAL proporcionado por ellos, durante 3 días diferentes y con resultados en el rango permitido, esto se logra en el transcurso de una semana. Se extiende una carta donde se manifiesta la calificación aprobatoria.

El 2° analista fue calificado por el 1°, con el mismo contextos que se siguió conmigo.

### **Calibración y/o validación de instrumentos y equipos.**

Para la Industria Farmacéutica la bibliografía oficial define a la calibración como: el conjunto de operaciones que determinan, la relación entre los valores indicados en un instrumento o sistema de medición y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia. Esta definición se aplicó para los instrumentos utilizados para realizar la prueba, como fue el Termómetro líquido en vidrio CBTA-01, marca Taylor, rango 0 a 50°C, cumpliendo con la calibración.

Para la validación de equipos como es el caso del Horno Geo-Lab que se utiliza en la preparación del material para obtenerlo en condiciones apirogénicas, se realiza inicialmente con la calificación de instalación, operación y desempeño del horno como anteriormente se menciono, pero a

diferencia de las calificaciones realizadas en la campana de flujo laminar y área aséptica, en este equipo donde se lleva a cabo un proceso de esterilización por vía seca (despirogenización), es necesario validar la cantidad de materiales que serán introducidos en su cámara, con la finalidad de garantizar que se cumplan con los parámetros de temperatura y tiempo necesarios para que el material se considere apirogenico.

Todas las pruebas de calificación, calibración y validación mencionadas anteriormente, se realizaron por personal autorizado bajo las normas Mexicanas Vigentes, quedando documentadas para la compañía.

## **8.2 PREPARACIÓN DE MATERIALES Y SOLUCIONES**

### **Material de Vidrio<sub>(15)</sub>**

Basándose en las Buenas Prácticas de Laboratorio, es necesario contar con óptimas condiciones de limpieza en todo el material utilizado en los laboratorios de calidad y aún más en los del área de microbiología por la delicadeza que implica el uso de microorganismos. Para fines del estudio el material se trató de la siguiente manera:

El material se talla con una solución de jabón neutro al 2% y se enjuaga con agua potable hasta eliminar el exceso de jabón, se realizó este proceso en dos ocasiones, posteriormente se sumerge en agua purificada por espacio de 15 a 20 minutos y se escurre.

Se introduce a la cámara del Horno Geo-Lab para someterlo al proceso de despirogenización en condiciones de 250°C por 2 horas.

Todo el material de vidrio que se utilizó para realizar la validación de la prueba de LAL tubo que pasar por el proceso antes descrito.

### **Preparación de Soluciones<sup>(5)</sup>**

Las soluciones utilizadas para los análisis son de referencia bibliográfica vigente:

Acido Clorhídrico 0.1N, libre de pirógenos: En un matraz aforado de 100 mL conteniendo 50 mL de agua libre de pirógenos, se agregaron 8.5mL de ácido clorhídrico concentrado y se aforó con agua libre de pirógenos. La solución se trasvasó a un matraz erlemeyer con tapón y se esterilizó en autoclave.

Solución Reguladora TRIS (pH 6.0 – 7.5): Se pesó 1.21 g de Hidroximetil Amino-Metano en papel aluminio despirogenizado, se colocó en un matraz de 500 mL despirogenizado y agregaron 100ml de agua libre de pirógenos, se agitó y ajustó el pH con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

### **8.3 PRUEBAS PREPARATORIAS<sup>(1,3,7)</sup>**

En esta etapa de la validación, se realizan los primeros cálculos para llevar a cabo el análisis.

La máxima concentración válida o MCV, es la máxima concentración de endotoxina bacteriana permitida en el producto, la cual no debe de producir en el producto una respuesta clínica pirogénica cuando se administra bajo la dosis indicada.

La máxima dilución válida o MDV, es la máxima dilución que se permite realizar para el producto.

Para la obtención de la MDV se utilizó el método II de la "Guideline on validation of the *Limulus polyphemus* Amebocyte Lysate test as an end-product Endotoxin test, for Human and animal parenteral drugs, Biological products, and Medical Devices" FDA, 1994.

En esta guía se marcan dos formas de calcular la MDV, siendo el mismo resultado final en ambas, esto sirve para comprobar que el cálculo obtenido es correcto, a continuación se muestra esto:

#### METODO I

$$\text{MVD} = \frac{\text{Límite de endotoxina} \times \text{Potencia del producto}}{\text{Sensibilidad del reactivo de LAL}}$$

$$\text{MVD} = \frac{0.01 / 100 \times 1,000,000}{0.06}$$

$$\text{MVD} = \mathbf{1666.667}$$

## METODO II

$$MVC = \frac{\lambda \times M}{K}$$

Donde:  $\lambda$  = Sensibilidad del reactivo  
M = Dosis Máxima en kg  
K = Cte. 5.0 UE/ kg

$$\text{Potencia} = 1,000,000 \text{ U}$$

$$MVC = \frac{0.06 \text{ UE/mL} \times 50,000 \text{ U/kg}}{5 \text{ UE/kg}} = 600 \text{ U/mL}$$

$$MVD = \frac{\text{Potencia}}{MVC} = \frac{1,000,000 \text{ U}}{600 \text{ U/mL}} = 1666.667 \text{ mL}$$

Producto	Potencia	Límite de endotoxina	Sensibilidad del reactivo ( $\lambda$ )	MVD Teórica
PENICILINA CLEMIZOL: SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ FCO,000 U	1,000,000 U	100 U/fco.	0.06 UE/mL	1:1666.667

**Tabla 2: Datos Teóricos Resumidos**

La tabla anterior indica que el producto Penicilina Clemizol : Sodica 4:1 con una potencia de 1,000,000 U por frasco, tiene un límite de concentración permitido (MCV) de 100 EU por frasco y una máxima dilución válida (MVD) para el producto de 1666.6 mL en agua apirogenica.

## **8.4 VALIDACIÓN DE LA PRUEBA<sub>(13)</sub>**

Cabe mencionar que en el laboratorio Farmacéutico ICN<sup>®</sup>, el termino validación para este tipo de análisis, se esta utilizando para comprobar la compatibilidad, confiabilidad y reproducibilidad como lo indica la guía utilizada.

A partir de esta etapa, se comienza ya el análisis experimental directamente con el método de determinación de Endotoxinas Bacterianas (LAL).

### **8.4.1 Determinación de la sensibilidad del reactivo de LAL<sub>(2,3)</sub>**

La sensibilidad es la mínima concentración de endotoxina bacteriana en una muestra, la cual puede ser detectada por el lisado de amebocitos de Limulus, sin que exista inhibición o realce de la reacción, se encuentra indicada en el marbete y se expresa en EU/mL. La mayor diferencia entre marcas de lisado radica en la sensibilidad. En el mercado existen diferentes marcas comerciales autorizados para el reactivo, en nuestro caso se utilizó la marca comercial Pyrotell.

El tiempo de gelificación se define, como aquel tiempo de incubación en minutos a 37°C, necesario para que se forme un gel firme de una mezcla de lisado y suspensión de la endotoxina en partes proporcionales.

Se entiende por gel firme, aquel gel capaz de mantener su integridad en el tubo de ensayo en posición invertida o girado a 180°

### Preparación del reactivo liofilizado "Lisado de Amebocitos de Limulus"

Reconstituya el frasco vial con 2mL de agua libre de pirógenos agitando suavemente en forma manual, evite la formación de espuma.

Una vez que se reconstituye el Lisado, dosifique con una micropipeta en volúmenes de 0.1mL en cada uno de los tubos de ensayo apirogenicos de 10 x 75 mm

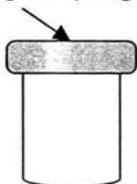
Se puede mantener en almacenamiento, a temperatura de congelación de – 10 a 0° C por no mas de 4 semanas.

### Preparación del frasco con la Endotoxina<sup>(2)</sup>

Reconstituya el frasco vial con la endotoxina con 5 mL de agua libre de pirógenos. Realizar las diluciones necesarias no mayores a 1:10 hasta obtener 1 UE/mL, posteriormente, realizar diluciones 1:2, cada una de ellas se prepara por cuadruplicado, agitando cada una por 60 segundos antes de realizar la siguiente dilución. A continuación se indica numéricamente lo realizado en el análisis:

El frasco contenía 2500 UE/vial, se agregó 5mL de agua libre de pirógenos obteniendo una solución de 500UE/mL, de aquí se inician las diluciones, como a continuación se muestra.

5 mL agua Apirogenica



**= 500 UE/mL**



1 mL de solución de endotoxina con 500UE+ 9 mL de agua libre de pirógenos  
(50 UE/mL)



1 mL + 9 mL de agua libre de pirógenos.  
(5 UE/mL)



1 mL + 4 mL de agua libre de pirógenos.  
(1 UE/mL)



1 mL + 1 mL de agua libre de pirógenos  
(0.5 UE/mL)



1 mL + 1 mL de agua libre de pirógenos. ( a partir de aquí se realiza la reacción)

(0.250 UE/mL)



1 mL + 1 mL de agua libre de pirógenos.  
(0.125 UE/mL)

Continúa ...

0.125 UE/mL  
  
1 mL + 1 mL de agua libre de pirógenos

(0.0625 UE/mL)

  
1 mL + 1 mL de agua libre de pirógenos.

(0.0312 UE/mL)

  
1 ml + 1 mL de agua libre de pirógenos

(0.015 UE/mL)

Para llevar acabo la reacción coloque:

0.1mL de cada una de las diluciones con endotoxina, desde 0.25 hasta 0.015 UE/mL en los tubos que contienen 0.1 mL de reactivo LAL, esto por cuadruplicado e incube  $60 \pm 2$  minutos a  $37 + 2$  °C.

Coloque por duplicado un control negativo, el cual se prepara colocando 0.1 mL de agua apirogenica en contacto con 0.1 mL de reactivo de LAL e incube en conjunto con la serie anterior.

Para el Control positivo, coloque 0.1 mL de endotoxina  $2\lambda$  (0.125 EU/mL) +0.1 mL reactivo LAL e incube con el resto de la serie. Al termino de la incubación, tomar cuidadosamente cada tubo e invertirlo lentamente  $180^\circ$ .

Concentración UE/mL	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4		Punto final de gelificación
	1	2	1	2	1	2	1	2	
0.250 (4λ)	+	+	+	+	+	+	+	+	0.250 UE/mL
0.125 (2λ)	+	+	+	+	+	+	+	+	0.125 UE/mL
0.0625 (λ)	+	+	+	+	+	+	+	+	0.0625UE/mL
0.0312 (½λ)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin gelificación
0.015 (¼ λ)	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin gelificación
Control Positivo	+	+	+	+	+	+	+	+	0.125 UE/mL
Control Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	Sin gelificación

**Tabla 3: Resultados de la prueba de Sensibilidad del reactivo de LAL utilizado**

Un resultado positivo (+), se caracteriza por la formación de un gel firme que mantiene su integridad cuando se invierte el tubo.

Un resultado negativo (-), se caracteriza por la ausencia de un gel firme o por la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad cuando se invierte el tubo.

Para la interpretación de los resultados anteriores, se parte de que la sensibilidad del reactivo indicada en el marbete era de 0.6 EU. Como se observa en la tabla de resultados sé esta comprobando experimentalmente este valor. Los controles tanto positivos como negativos son correctos, con lo que se asume que la prueba de comprobación de sensibilidad es correcta.

### 8.4.2 Curva de Inhibición<sub>(3,8)</sub>

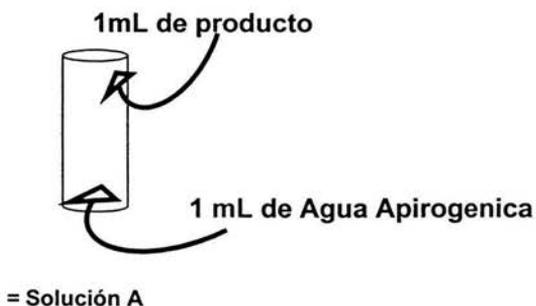
El termino curva en este estudio, se refiere a la serie de tubos con las diluciones de endotoxina realizadas y que son sometidas a la reacción con el reactivo de LAL. La finalidad de esta parte es demostrar que la formula del producto no interfiere en la formación del tapón de gel.

La metodología consiste en realizar una serie de diluciones con el producto, desde la primera dilución, su MDV calculada, y diluciones posteriores, en contacto con solución de endotoxinas en concentraciones conocidas y llevar acabo la reacción con el reactivo de LAL. ( en la metodología se observa mejor esto).

Serie de diluciones realizadas para el producto PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ frasco lote 8H 4071 y Endotoxina con dos diferentes concentraciones  $4\lambda$  y  $2\lambda$ . El producto se encuentra en forma sólida por lo que, a cada uno de 15 frascos se les adiciona 1mL de agua; se coloca la mezcla en un recipiente apirogenico

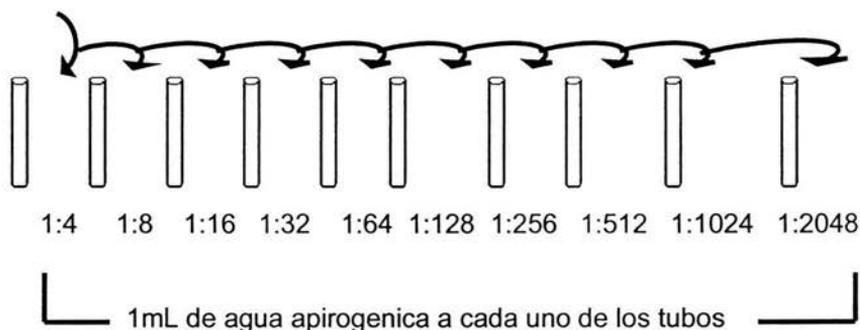
#### Metodología:

**Paso I.-** Añadir 1mL de agua libre de pirógenos y 1mL de producto al primer tubo.



A partir de esta solución realizar las siguientes diluciones:

Solución A



**Paso II.**-Añadir 1mL de endotoxina  $4\lambda=0.25$  UE/mL a cada tubo desde dilución 1:4 hasta dilución 1:2048, agitar 1 min entre cada dilución.

**Paso III.**-Realizar la reacción con el reactivo de LAL, tomando por separado 0.1mL de cada una de la diluciones anteriores y 0.1 del reactivo de LAL en un tubo de 10 x 75mm apirogenicos, por duplicado. Incubar a 37°C durante 60 minutos.

Colocar por duplicado controles positivos y negativos.

**Paso IV.**- Lectura positiva (+): Presencia de un gel firme al girar 180°

Lectura negativa (-): Ausencia de un gel firme al girar 180°

Realizar todos los pasos anteriores para la solución de endotoxina en concentración de  $2\lambda$ .

RESULTADOS DE ENDOTOXINA 4λ										
	D	I	L	U	C	I	O	N	E	S
RÉPLICA	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
1	Negativo	Positivo								
2	Negativo	Positivo								

CONTROL POSITIVO =POSITIVO

CONTROL NEGATIVO=NEGATIVO

**Tabla 4: Resultados de la prueba de inhibición del producto en concentración de 4λ**

RESULTADOS DE ENDOTOXINA 2λ										
	D	I	L	U	C	I	O	N	E	S
RÉPLICA	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048
1	Negativo	Positivo								
2	Negativo	Positivo								

CONTROL POSITIVO =POSITIVO

CONTROL NEGATIVO=NEGATIVO

**Tabla 5: Resultados de la prueba de inhibición del producto en concentración de 2λ**

### Interpretación:

Para ambas tablas se observa que, en la dilución 1:4 el resultado es negativo, esto se debe a que el producto se encuentra en mayor concentración lo que interfiere en la formación del coagulo. A partir de la dilución 1:8 y hasta la dilución 1:2048 el resultado es positivo como se espera, ya que se tiene endotoxina presente, además nos indica que la formula no inhibe la formación del tapón de gel. Recordemos que la MDV calculada es de 1666.67 la cual se encuentra en el rango de 1:1024 y 1:2048 y aquí tampoco existe inhibición.

Los controles positivos y negativos son correctos

Con la finalidad de facilitar la metodología y observando los datos de la curva de inhibición se decide que la dilución del producto sea de 1:1000 (no se rebasa la dilución permitida).

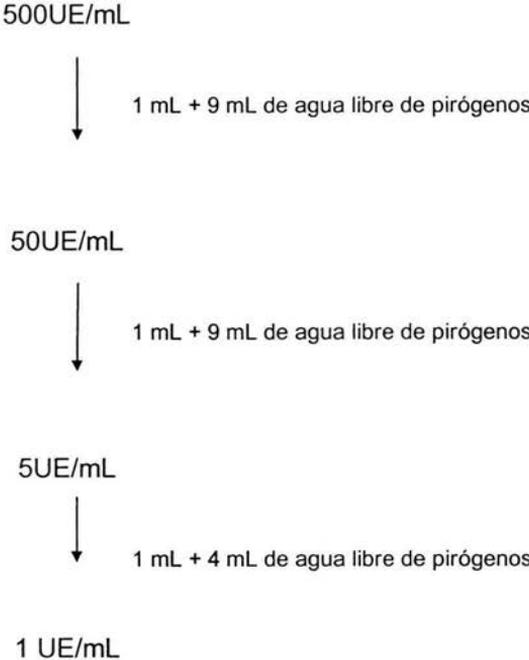
#### **8.4.3 Curva Compatibilidad<sub>(3,9)</sub>**

Como ya se comprobó que el producto no inhibe, se procede a realizar la prueba de compatibilidad con la curva de endotoxina normal, por una parte se trabaja una curva blanco con agua y por otro lado la curva del producto diluido.

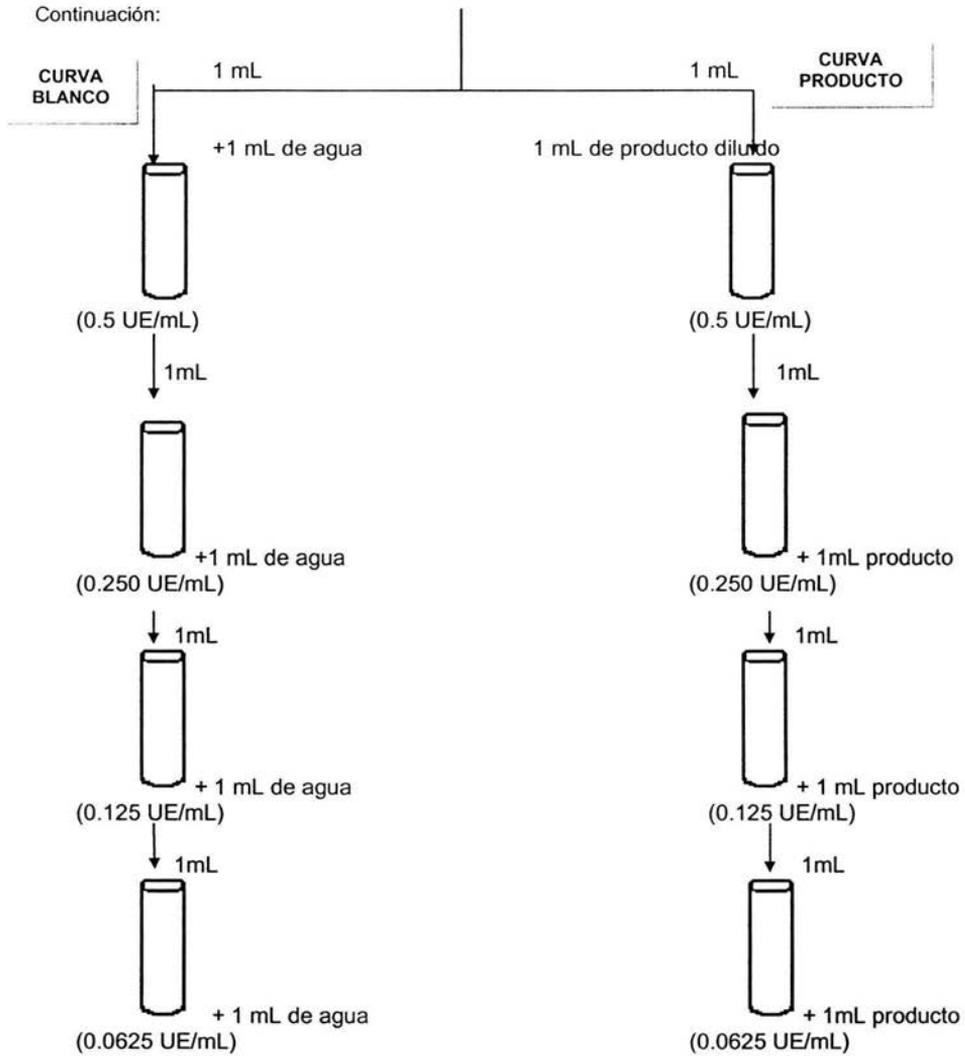
Esta prueba se realiza por separado con 3 lotes diferentes de producto PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ frasco, lotes 8H 4071, 8F4034 y 8H4068:

Producto: En condiciones asépticas, a cada uno de 15 frascos se les adiciona 1 mL de agua apirogenica, se agitan por 1 minuto, se retira sello de aluminio y tapón de plástico, la mezcla se coloca en un matraz apirogenico, se mezcla; en otro matraz apirogenico se coloca 1mL de la mezcla anterior y se adiciona 999 mL de agua apirogenica. Esta es la suspensión que será evaluada.

Endotoxina: El frasco contiene 2500 UE/vial se adicionan 5 mL de agua apirogenica, quedando 500 UE/mL, se continua como se describe:

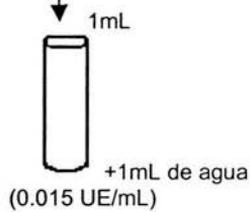
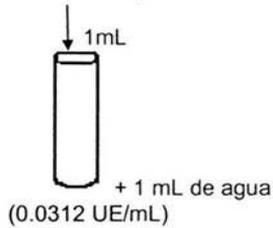


Continuación:

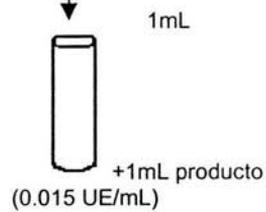
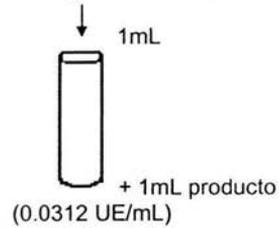


continuación...

(0.0625 UE/mL)



(0.0625UE/mL)



Se realiza la reacción a partir de la concentración de 0.25 UE/mL hasta 0.015 UE/mL en ambas curvas, por cuadruplicado.

Se coloca 0.1 mL de cada una de las diluciones en tubos 10 x 75 mm + 0.1mL de reactivo de LAL, se incuba durante 60 minutos a 37°C ± 2 °C.

#### CONTROLES

- Por cada curva 4 controles positivos con 2λ de endotoxina diluida en agua.
- 4 controles negativos con agua utilizada en las diluciones y del producto diluido sin endotoxina.
- 4 controles con agua.

## RESULTADOS DEL PRODUCTO (Endotoxina con producto)

**Tabla 6: Resultados del producto PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA**

**4:1 con 1,000,000 U/ Frasco Lote 8H4071**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	-	+	+	+	-	-	6.8	0.0625
2	+	-	-	+	+	+	-	-	6.8	0.0625
3	+	-	-	+	+	+	-	-	6.8	0.0625
4	+	-	-	+	+	+	-	-	6.8	0.0625

**Tabla 7: Resultados del producto PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1**

**con 1,000,000 U/ Frasco Lote 8F4034**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	-	+	+	+	+	-	7.5	0.0312
2	+	-	-	+	+	+	+	-	7.5	0.0312
3	+	-	-	+	+	+	+	-	7.5	0.0312
4	+	-	-	+	+	+	+	-	7.5	0.0312

**Tabla 8: Resultados del producto PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1  
con 1,000,000 U/ Frasco Lote 8H4068**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	-	+	+	+	-	-	7.7	0.0625
2	+	-	-	+	+	+	-	-	7.7	0.0625
3	+	-	-	+	+	+	-	-	7.7	0.0625
4	+	-	-	+	+	+	-	-	7.7	0.0625

**RESULTADOS DEL BLANCO (Endotoxina y agua)**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625
2	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625
3	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625
4	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625

NA. No aplica

**Tabla 9: Resultados de la curva del Blanco**

## Interpretación de los resultados

El reactivo de LAL con el que se trabajó la prueba, reporta en su marbete una sensibilidad de 0.06 UE.

Los resultados de la curva del blanco muestra que el último punto de gelificación fue en la concentración de 0.0625UE/mL, lo que corresponde a la sensibilidad reportada por el proveedor.

Los resultados de las curvas de los productos con lotes 8H4071 y 8H4068 tuvieron como último punto de gelificación en la concentración de 0.0625 UE/mL , lo que esta correspondiendo con la curva del blanco y por otra parte con lo reportado por el proveedor.

Los resultados de la curva del producto con lote 8F4034 donde se observa que el último punto de gelificación fue en la concentración de 0.0312 UE/mL, este valor es el mínimo aceptable, ya que el rango de tolerancia para esta prueba va de  $2 \lambda$  a  $\frac{1}{2} \lambda$  y para este caso en concentración es de 0.125 a 0.0312.

Con el análisis de ambas curvas, blanco y de los 3 lotes de producto podemos decir que el producto es compatible con la prueba ya que los resultados obtenidos se encuentran dentro de la tolerancia.

## 8.5 REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO<sup>(1,3,13)</sup>

La reproducibilidad se entiende como la precisión que un método presenta, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes analistas.

Precisión, es el grado de concordancia entre resultados cuando el procedimiento se aplica repetidamente en una muestra.

En el caso de este análisis, la determinación de Endotoxinas Bacterianas se realizó con un segundo analista, en un día diferente y repitiendo la misma metodología para las pruebas de compatibilidad, antes descrita, para el producto PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ Frasco lotes 8H4071, 8F4034 y 8H4068.

RESULTADOS DEL PRODUCTO 2° ANALISTA (Endotoxina con producto):

**Tabla 10: PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/  
Frasco Lote 8H4071**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
2	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
3	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
4	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625

**Tabla 11: PENICILINA CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ Frasco**  
**Lote 8F4034**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
2	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
3	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
4	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625

**Tabla 12: PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ Frasco Lote 8H4068**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
2	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
3	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625
4	+	-	-	+	+	+	-	-	7.6	0.0625

**RESULTADOS DEL BLANCO (Endotoxina con agua)**

RÉPLICA	Control positivo	Control Negativo	Producto diluido sin Endotoxina	0.250 UE/mL	0.125 UE/mL	0.0625 UE/mL	0.0312 UE/mL	0.015 UE/mL	pH Final	Punto final de gelificación
1	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625
2	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625
3	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625
4	+	-	NA	+	+	+	-	-	NA	0.0625

NA. No aplica

**TABLA 13: Resultados de la curva Blanco**

Como se puede observar en las tablas de los lotes 8H4071, 8F4034 y 8H4068, los resultados obtenidos con el segundo analista corresponden a la concentración reportada en el marbete (0.06 UE), indicando por una parte que existe reproducibilidad con la técnica y por otra parte, entre ambos analistas.

### PRUEBAS COMPARATIVAS<sup>(3,13)</sup>

Por último se realizan pruebas comparativas entre el método oficial (conejos) y el método de LAL.

La prueba se realizó con 10 lotes distintos del producto, con dos analistas distintos solo para la prueba de LAL (siguiendo la metodología de compatibilidad).

### RESULTADOS

Número	PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ FCO lote No:	Resultado Método Oficial (Conejos) 1 <sup>er</sup> Analista
1	8H 4082	Pasa la Prueba
2	8H 4081	Pasa la Prueba
3	8J 4083	Pasa la Prueba
4	8F 4032	Pasa la Prueba
5	8F4033	Pasa la prueba
6	8F 4034	Pasa la prueba
7	8G 4051	Pasa la prueba
8	8G 4052	Pasa la Prueba
9	8H 4068	Pasa la Prueba
10	8H 4071	Pasa la Prueba

**Tabla 14: Resultados primer analista con la prueba oficial**

Como se observa en la tabla, la prueba de pirógenos por el método tradicional no muestra ningún problema en los 10 lotes de producto analizados, indicándonos que no existe problemas de pirógenos.

Para la realización del método de endotoxinas bacterianas, tapón de gel, se realiza en los mismos lotes que en la prueba tradicional por conejo.

## RESULTADOS

Número	PENICILINA G CLEMIZOL:SODI CA 4:1 con 1,000,000 U/ FCO lote No:	Resultado Método alternativo LAL 1 <sup>er</sup> analista	Resultado Método alternativo LAL 2 <sup>do</sup> analista
1	8H 4082	Pasa la Prueba	No se detectan
2	8H 4081	Pasa la Prueba	No se detectan
3	8J 4083	Pasa la Prueba	No se detectan
4	8F 4032	Pasa la Prueba	No se detectan
5	8F4033	Pasa la prueba	No se detectan
6	8F 4034	Pasa la prueba	No se detectan
7	8G 4051	Pasa la prueba	No se detectan
8	8G 4052	Pasa la Prueba	No se detectan
9	8H 4068	Pasa la Prueba	No se detectan
10	8H 4071	Pasa la Prueba	No se detectan

**Tabla 15: Resultados comparativos entre el primer analista y el segundo analista para la prueba de LAL**

Como se puede observar en la tabla, los resultados entre ambos analistas con el método de LAL, son correctos.

## 9. CONCLUSIONES

Con ayuda de la guía de validación fue posible determinar que el producto parenteral PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ Frasco, tiene 100UE /frasco como límite de endotoxinas bacterianas; su máxima dilución válida es de 1:1666, proponiendo nosotros (por funcionalidad) una dilución de 1:1000 comprobada con la curva de inhibición que no existe ningún tipo de interferencia con ella y que el resultado obtenido es confiable.

Evaluando la información obtenida en el estudio se comprueba la importancia que tiene el llevar un control en la calificación, calibración y validación de equipos e instrumentos utilizados, no solamente en este trabajo, sino en general en la Industria Farmacéutica, el haberlo realizado nos permite tener mayor confianza en los resultados obtenidos.

Es importante enfatizar, que la capacitación en el personal es una herramienta elemental para cualquiera de las actividades que se realizan en el análisis y/o fabricación de medicamentos. Se propone a la empresa que para poder llevar acabo las pruebas de detección de endotoxinas bacterianas en productos parenterales, es necesario capacitar al analista en la técnica, documentando que se encuentra apto teóricamente y experimentalmente en el método.

Con la curva de inhibición, podemos concluir que el producto parenteral PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ Frasco, dará un resultado real de su calidad, ya que es aquí donde se comprueba que su fórmula no interfiere con la endotoxina que pueda estar presente,

permitiendo una dictamen confiable en la existencia o ausencia de pirógenos, por medio del método de LAL (tapón de gel) .

Con la curva de compatibilidad, podemos concluir que el producto parenteral PENICILINA G CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ Frasco, es afín con el reactivo de LAL comprobando esto, cuando la curva del blanco y la del producto diluido se llevan acabo dentro del rango de concentración permitida. Por otro lado, se comprueba que tan sensible es la prueba, ya que se llega hasta una concentración de detección de endotoxinas en el producto de 0.03UE/mL, lo que garantiza una mayor calidad.

Con los resultados obtenidos en cuanto a la precisión de los analistas se observa que hay un adecuado manejo del reactivo de LAL, lográndose de esta manera que no exista diferencia importante en los resultados obtenidos, lo que se traduce en resultados confiables para las pruebas subsecuentes.

Se comprueba que este método tiene las ventajas en el tiempo de respuesta de dictamen de un producto, además de que su costo es menor, ya que su almacenaje es mínimo en comparación a la existencia de un biotério con todas las regulaciones que este debe de tener.

Concluyendo integralmente todo lo antes mencionado, podemos afirmar que el método de Endotoxinas Bacterianas (tapón de gel) para el producto parenteral PENICILINA CLEMIZOL:SODICA 4:1 con 1,000,000 U/ Frasco, queda validado ya que sé cumplió con los requisitos de compatibilidad, reproducibilidad y confianza, así como un alto grado de sensibilidad, permitiendo proponerlo como sustitución en la prueba de pirógenos con el método tradicional.

## ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

### 10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Pyrogens Endotoxins, LAL Testing, and depyrogenation; advances in Parenteral Sciences 2. Frederick C. Pearson, III. Travenol Laboratories, Inc.
2. Mallinckodt. Manual Pyrogen. Mallinckodt Inc. St Louis Missouri. (1982).
3. Food and Drug Administration National Center for drugs and Biologics Office of drugs. Draff " Guideline for Validation of the *Limulus polyphemus* Amebocyte Lysate test as an end-product endotoxin test for Human animal parenteral drugs, biological products, and medical devices" 1994
4. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas PLM. Editorial PLM, S.A. de C.V. 20ª Edición; 1996.
5. Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos 7ª Edición. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos; Secretaria de Salud.
6. USP 26 The United States Pharmacopeia; NF 21 National Formulary; United States Pharmacopeial Convention, Inc. January 2003.
7. Marlys E. Weary; " Understanding and Setting Endotoxin Limits", Baxter Healthcare Corporation, Baxter Technology Center, Round Lake, Illinois; Vol 44 No 1/ January-February 1990.

8. LAL Review "Overcome Your Inhibitions"; Walkersville, Maryland 21793, Winter 1994. Published by Bio Whittaker.
9. LAL "What's Special About Power Curve?"; Walkersville, Maryland 21793, Summer 1994. Published by Bio Whittake
10. Dennis E. Guilfoile, James F. Yager and Sebastian L. carito "The Effect of Refrigeration and Mixing on Detection of Endotoxin in Parenteral Drugs Using The *limulus polyphemus* Amebocyte Lysate (LAL) Test", Technology/Applications; Vol 43 No 4 July-August 1989
11. The European Pharmacopoeia Fouthth Edition, Council of Europe; Council of Europe, Strasbourg Cedex, France 2001
12. Remo M. Bergoglio, Antibioticos, Quinta edición, editorial medica Panamericana, Argentina 1993.
13. Guía de Validación de métodos analíticos, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, Ed 2002.
14. Brock Thomas D. Madigan Michael T, Microbiología, Ed. Prentice Hall Hispanoamericana 6ª Ed 1993.
15. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria farmaceutica dedicados a la fabricación de medicamentos

16. Harris G, Dictionary of organic compounds, Ed. Board
17. Budavon Susan, The Merck Index and Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals, Merck and Co. Inc. Twelfth edition USA 1996
18. <http://transparencia.imss.gob.mx:8080/normasGS010/G010/clindamisina,%s%20oluci%D3N520inyectable.pdf>
19. <http://onfoleg.mecon.gov.ar/txtnorma/dto202-2003-40,htm>
20. <http://cienciareal.tripod.com.pe/davrayexotoxinas.html>
21. <http://es.wikipedia.org/wiki/penicilina>
22. <http://www.alashimnjournal.cl/revistas/16imprime/0,1992,PRT%253D1497%2526LNID%253DI,00.html>