

16  
29



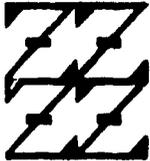
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

**DETERMINACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS  
MEDIANTE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS  
EN PRODUCTOS ONCOLOGICOS**

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

**U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A**



**10 ANIVERSARIO DE  
DE NUESTRA FACULTAD**

ASESOR: CESAR ESCAMILLA FLORES

MEXICO, D. E.

AGOSTO DE 1996

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

**DEDICATORIAS**

**A MIS PADRES**

**BELEM ENCISO GALICIA  
GEORGINA ARRIETA VALVERDE**

*LES DEBO TODO MI CARIÑO Y APOYO. GRACIAS POR QUE USTEDES HAN SIDO UNA  
FUENTE CONTINUA PARA QUE LOGRARA ALCANZAR UNO DE MIS OJETIVOS,  
PARA INICIAR EL VUELO EN EL MUNDO PROFESIONAL.*

**A MIS HERMANAS**

**ROCIO  
OLIVIA  
MARCELA  
ANA MARIA**

*POR SU MOTIVACION Y AYUDA, POR SER BUENAS HERMANAS Y  
COMPAÑERAS.*

**A DIOS POR HABERME PERMITIDO QUE LLEGARA A ESTA ETAPA DE MI VIDA**

**RECONOCIMIENTOS**

**A LAS PROFESORAS:**

Q.F.B. DOMITILA BURGOS JARA

Q.F.B. IDALIA FLORES GOMEZ

Q.F.B. GUILLERMINA ROJAS FERNANDEZ

Q.F.B. MARTHA UGALDE HERNANDEZ

POR SU INTERES MOSTRADO EN LA REVISION DEL TRABAJO ESCRITO, Y A QUE SIN  
SU AYUDA NO SE HUBIERA LOGRADO CULMINAR ESTE TRABAJO.

**A MI PROFESOR Y ASESOR:**

Q.F.B. CESAR ESCAMILLA FLORES.

POR SU TAN VALIOSA AYUDA EN LA ASESORIA DE ESTE TRABAJO.

**HAGO PATENTE MI AGRADECIMIENTO A LOS LABORATORIOS  
HISTRY S.A. DE C.V. Y A LA GERENTE DE CONTROL DE CALIDAD  
PATRICIA VAZQUEZ POR HABERME PERMITIDO REALIZAR ESTE TRABAJO,  
Y POR SER LA INDUSTRIA DONDE INICIE PARTE DE MI VIDA PROFESIONAL.**

**AL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, EN ESPECIAL A PATRICIA  
MENDEZ SOSA. YA QUE SIN SU ACEPTACION NO HUBIERA SIDO POSIBLE ESTE  
TRABAJO Y POR HABERME BRINDADO SU APOYO Y AMISTAD CUANDO MAS LA  
NECESITE.**

**A TODOS MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL DEPARTAMENTO DE CONTROL  
QUIMICO POR LOS BUENOS MOMENTOS QUE HEMOS COMPARTIDO.**

**A Q.F.B. NOE RICO CONTRERAS**

*POR SER UN GRAN AMIGO Y COMPAÑERO, POR HABERME AYUDADO SIEMPRE DE MANERA INCONDICIONAL TODO ESTE TIEMPO, Y POR TU APOYO EN LOS MOMENTOS MAS DIFICILES Y POR COMPARTIR TUS CONOCIMIENTOS EN LA ELABORACION DE ESTE TRABAJO.*

*A LA FAMILIA MARTINEZ VILLA POR SU AMABILIDAD MOSTRADA, A TI LAURA POR BRINDARME TU AMISTAD Y TU AYUDA DE BUENA VOLUNTAD, POR QUE SIN ELLA NO HUBIERA TERMINADO ESTE TRABAJO.*

**A LA PROFESORA ROSALINDA ESCALANTE POR TENER GRAN CALIDAD COMO  
PERSONA. POR SUS CONSEJOS, QUE NO DUDARE EN USAR EN MI VIDA PROFESIONAL.**

**A TODOS MIS AMIGOS**

**ANA YOLOTL A. O. , LILIA S. C. , ROCIO T. B. , SANDRA A. V. , CAROLINA C. A. ,**

**LORENA S. L. , EDUARDO R. G. , JOSE LUIS R. P. , JAIME O. P.**

**POR HABERME BRINDADO ALGO TAN IMPORTANTE COMO ES SU AMISTAD.**

**A TODOS LOS QUE EN ALGUN MOMENTO PRESTARON SU AYUDA Y**

**COLABORACION**

**!! GRACIAS !!**

UNA META ES MAS QUE UN DESEO, ES MAS QUE PROPOSITO. LOGRAR UNA META,  
ES NO SOLO PERSEGUIR UN FIN, ES TOMAR LA DETERMINACION DE LOGRAR ALGO  
ESPECIFICO Y CONCRETO.

! QUERER ES PODER! DECIDETE A LOGRAR TUS PROPOSITOS, NO DESVIES TU  
VISTA, SIGHE PASO A PASO, ADELANTE DIA A DIA, Y VERAS QUE CON  
PERSEVERANCIA Y TE LLGARAS A DONDE TU DECIDAS LLEGAR.

LA AMISTAD ES UN TESORO. ES RICO EL QUE TBENE AMIGOS. PERO NO  
CONFUNDAMOS LA AMISTAD CON EL OPORTUNISMO. LA AMISTAD NO ES  
UTILIZAR A LOS DEMAS O APROVECHARSE DE NUESTROS SEMEJANTES. LA  
AMISTAD HAY QUE CULTIVARLA CUIDANDO DE QUE NO CRESCAN MALAS  
HIERBAS QUE DESTRIYAN LAS FLORES DE LA AMISTAD.

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>I FUNDAMENTACION DEL TEMA</b> .....	<b>3</b>
<b>A. ENDOTOXINAS BACTERIANAS</b> .....	<b>4</b>
1. NATURALEZA DE LAS ENDOTOXINAS .....	<b>4</b>
2. METODOS DE DETECCION DE PIROGENOS .....	<b>7</b>
2.1 PRUEBA EN CONEJOS .....	<b>7</b>
2.2 PRUEBA LAL .....	<b>8</b>
2.2.1 FUNDAMENTO BIOQUIMICO .....	<b>11</b>
2.2.2 MECANISMO DE REACCION .....	<b>11</b>
3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS .....	<b>14</b>
<b>B. VALIDACION</b> .....	<b>15</b>
<b>C. PRODUCTOS ONCOLOGICOS</b> .....	<b>18</b>
1. METOTREXATO .....	<b>21</b>
2. CISPLATINO .....	<b>24</b>
<b>II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>27</b>
<b>III OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>IV HIPOTESIS</b> .....	<b>29</b>
<b>V MATERIAL Y EQUIPO</b> .....	<b>30</b>

<b>VI DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>	<b>33</b>
<b>DIAGRAMA DE BLOQUES .....</b>	<b>34</b>
<b>A. TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL Y PREPARACION DE SOLUCIONES. ....</b>	<b>36</b>
<b>B. CALIFICACION DEL AREA DE TRABAJO .....</b>	<b>38</b>
<b>C. PRUEBAS PREPARATORIAS .....</b>	<b>39</b>
1. Preparacion del Liofilizado Lisado de Amebocitos de Limulus .....	39
2. Preparacion de la solución de Endotoxina 1.0 EU/ml .....	39
3. Determinación de la Potencia de Endotoxina .....	41
<b>D. VALIDACION DEL METODO .....</b>	<b>43</b>
1. Confirmación de la Sensibilidad del Reactivo .....	43
2. Cálculo Teórico de la Máxima Dilución Válida .....	45
2.1 Metotrexato .....	45
2.2 Cisplatino .....	47
3. Prueba de Compatibilidad / Inhibición .....	48
<b>E. DETERMINACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN LOS PRODUCTOS ONCOLOGICOS. ....</b>	<b>51</b>
<b>F. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE CUANTIFICACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS. ....</b>	<b>52</b>

<b>VII RESULTADOS Y ANALISIS.....</b>	<b>53</b>
<b>VIII CONCLUSIONES .....</b>	<b>68</b>
<b>IX SUGERENCIAS.....</b>	<b>69</b>
<b>X BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>70</b>
<b>XI ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Membrana celular de las bacterias Gram-Negativa .....	4
Figura 2. Estructura de un Lipopolisacárido .....	5
Figura 3. Estructura de un Lipopolisacárido de <i>Salmonella</i> .....	6
Figura 4. Estructura química del Lípido A .....	6
Figura 5. Métodos de detección de Endotoxina .....	10
Figura 6. Reacción de Gelificación .....	13
Figura 7. Formación de complejos reactivo en solución acuosa .....	24
Figura 8. Diagrama de Flujo de Metodología .....	34
Figura 9. Diagrama de causa-efecto de la validación del método .....	35

## b) INDICE DE FORMULAS

Formula 1. Para cálculos de Sensibilidad y Media Geométrica .....	73
Formula 2. Para determinación de Desviación Estandar .....	73
Formula 3. Para determinación de Potencia de Endotoxina .....	74
Formula 4. Para determinación de Límite de tolerancia .....	74

**c) INDICE DE ESQUEMAS**

Esquema 1. Dilución de Endotoxina Típica 1.0 EU/ml. ....	<b>40</b>
Esquema 2. Curva Estandar de Endotoxina .....	<b>42</b>
Esquema 3. Diluciones para prueba de Compatibilidad. ....	<b>50</b>

## *INTRODUCCION*

La Food and Drug Administration ( F. D. A. ), ha establecido que la validación de procesos es un requisito de las Buenas Prácticas de Manufactura (Good Manufacture Practices) , para productos farmacéuticos terminados.

La validación, es un proceso que puede reducir la dependencia de análisis completos a productos en proceso o terminados, con lo que habrá un ahorro económico de material, reactivos, mano de obra, que se compensa considerablemente en el gasto económico que se efectúa para llevar a cabo la validación.

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

Tomando en cuenta lo anterior, la Industria Farmacéutica, se ha esforzado por mantenerse a la vanguardia en el desarrollo e implementación de nuevas, mejores y eficientes técnicas de análisis de los productos farmacéuticos.

Dentro de los productos farmacéuticos que se consideran críticos por la complejidad en su control y fabricación se encuentran los productos inyectables. Una de las pruebas críticas para dicha forma farmacéutica es la Prueba de Pirógenos.

La Prueba de Pirógenos es muy importante , ya que de ella depende en gran parte que un producto estéril salga al mercado. Esta prueba se ha venido realizando en conejos, ya que desde 1942 es la prueba oficial en la United States Pharmacopeia, para detección de pirógenos en materias primas y productos terminados. Actualmente se tiene la posibilidad de sustituir esta prueba por el método LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus ), siempre y cuando se lleve a cabo la validación previa de la técnica, y los resultados sean aprobados por la Secretaría de Salud.

El método LAL es más sensible, específico, simple, barato y además de ser una prueba reproducible, la cual se lleva a cabo por una mezcla de partes iguales del reactivo LAL y la muestra en estudio De donde el reactivo LAL en presencia de pirógenos (endotoxina bacteriana) da una reacción enzimática, formando un coágulo opalescente y firme.

La importancia de realizar la validación actualmente, no sólo radica en reducir costos, obtener beneficios y mejorar el Control de la Calidad del análisis de estos productos, o para cumplir con los reglamentos de la Secretaría de Salud y la FDA, sino para optimizar el sistema de análisis, ya que a través de la validación se pueden encontrar los puntos claves del método, logrando que el producto satisfaga las especificaciones dadas.

En este trabajo de investigación y experimentación, se pretende demostrar la compatibilidad, confiabilidad y reproducibilidad de la prueba de detección de pirógenos por el método LAL, como sustituto de la prueba oficial en conejos. El método se validó para los productos Oncológicos Cisplatino y Metotrexato, los cuales, se usan como terapia para el control del cáncer y son llamados agentes o medicamentos Citostáticos, antineoplásicos y en general comúnmente llamados Oncológicos. Estos actúan sobre mecanismos bioquímicos y de reproducción celular, tanto para células cancerosas como para células normales. Además de sus propiedades citotóxicas, estos medicamentos, son potencialmente mutagénicos y teratogénicos,<sup>(18)</sup> debido a esto se propone no realizar la prueba en conejos, buscando como alternativa el método LAL, por ser más sensible y además de que se requiere menor cantidad de muestra para la prueba, lo que evitaría estar más tiempo en contacto con dichos productos, y en cuanto al uso de conejos sería mayor, ya que se utilizarían sólo una vez por la toxicidad causada en dichos los animales, lo que involucraría un incremento en el gasto económico; otra ventaja es el tiempo ya que en la prueba en conejos se necesitan por lo menos 3.5 h de análisis como mínimo y con la prueba LAL en una hora se obtienen resultados.

## I. FUNDAMENTACION DEL TEMA

### A. ENDOTOXINAS BACTERIANAS - PIROGENOS

Este término se empleó para describir este contaminante como el principal y el más potente de efecto biológico capaz de producir fiebre, ya que son componentes o desechos celulares del metabolismo de las bacterias Gram- Negativas.

De tal forma que está sustancia, es un complejo Lipo-polisacárido que al estar en contacto en el torrente sanguíneo del hombre, este puede causar fiebre, shock y hasta la muerte dependiendo de la concentración a la que se encuentre. De lo anterior se deduce la importancia que tienen los productos Inyectables de que se encuentren libres de endotoxinas bacterianas. <sup>(1,2)</sup>

Son complejos lipopolisacárido-proteína procedentes de las paredes celulares por el metabolismo de bacterias, estos componentes son liberadas al medio cuando se mueren las bacterias Gram- Negativas (-), o cuando se autolisan. Estas sustancias se encuentran en la capa más externa de la pared celular, estos pirógenos son muy potentes y estables a temperaturas elevadas y por estar asociadas a las bacterias Gram- Negativas se encuentran en todas partes: como en el aire, agua, materias primas etc. y por ser difíciles de eliminar, son las que constituyen el problema más frecuente en la fabricación de parenterales en la Industria Farmacéutica. <sup>(3,5,6,7)</sup>

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 el proceso de fabricación por medio de las Buenas Prácticas de Manufactura. <sup>(12)</sup>

Es por ello el interés de la Industria Farmacéutica por contar con métodos adecuados y confiables para la detección de endotoxinas en materias primas, materiales de empaque, producto en proceso y en producto terminado.

### 1. NATURALEZA DE LAS ENDOTOXINAS - PIROGENOS

En su estado natural la endotoxina bacteriana es un complejo formado por lípidos, carbohidratos y proteínas; este complejo está caracterizado por poseer carga negativa y alto peso molecular. (peso aproximado de 1,000,000 daltons). <sup>(1,6, 9)</sup> Esto se muestra en la figura 1.

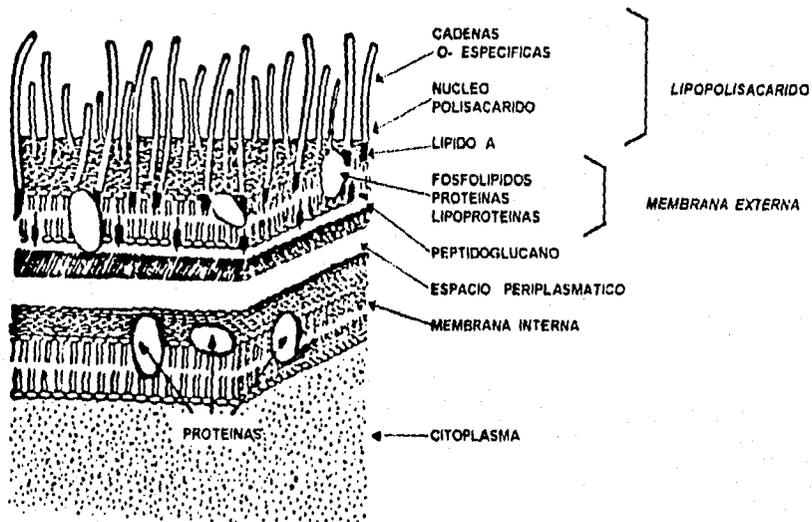


FIGURA 1. MEMBRANA CELULAR GRAM - NEGATIVA

Las endotoxinas altamente purificadas, no contienen proteínas y por su composición química se les considera como compuestos Lipopolisacaridos, (LPS). (14) Esto se muestra en la figura 2.

Las endotoxinas aisladas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas (LPS) poseen tres regiones químicas que son:

- La región más interna, también llamada "Lípido A".

La parte lipídica "A" está compuesta de un disacárido de Glucosamina, que está altamente sustituido con aminos y esterificado a un ácido graso de cadena larga; comúnmente es el ácido B-Hidroximirístico de catorce carbonos. Esto se muestra en la figura 4. Esta parte lipídica es la responsable de la pirogenicidad y de la mayoría de las actividades biológicas de la endotoxina, por lo que también es responsable de su hidrofobicidad por su carga negativa.

- La región intermedia, polisacárido que junto con la parte "A" forma el centro o corazón de la endotoxina.

- La región externa formada por un polisacárido "O" específico. Estas se muestran en la figura 3.

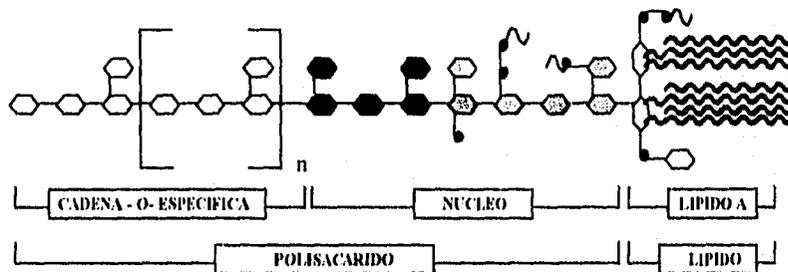
El Lipopolisacárido "O" es el responsable de la inmunoespecificidad de la endotoxina. (15)

La endotoxina puede ser inactivada por destrucción de la molécula del lipopolisacárido, es decir cuando los microorganismos se autólisan o se fragmentan por métodos mecánicos o químicos se liberan al medio.

Entre ellos encontramos el calor, generalmente se destruyen esterilizando por calor a 250 °C durante 30 minutos, también usando ácidos o bases diluidas, sustancias oxidantes, agentes alquilantes y por radiaciones. (16)

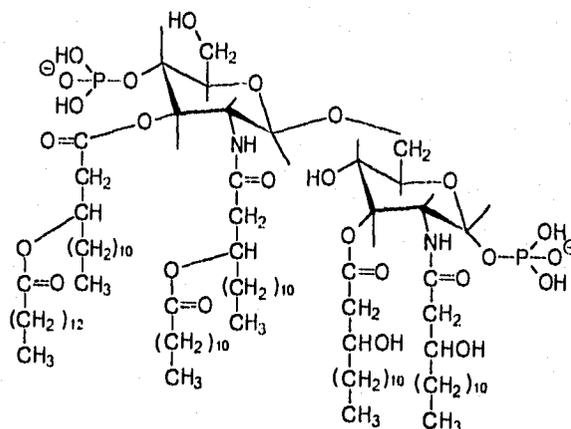


**FIGURA 2. ESTRUCTURA GENERAL DE UN LIPOPOLISACARIDO: CADENA DE POLISACARIDO INMUNOESPECIFICA, POLISACARIDO COMUN Y LIPIDO "A" REGION TOXICA**



**FIGURA 3. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA ESTRUCTURA DE UN LIPOPOLISACARIDO DE *Salmonella***

La estructura del lípido "A" está proximal a la región núcleo (KDO - Trisacáridos). El número de residuos de Ácidos Grasos es arbitrario (  $\sim$  ).  $\sim$  Fosforetanolamina • Fosfatos; Residuos de Azúcar  $\square$



**FIGURA 4. ESTRUCTURA DE LIPIDO "A"**

## 2. METODOS DE DETECCION DE PIROGENOS

Los métodos para detectar pirógenos son :

### 2.1 Prueba en conejos

### 2.2 Prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus ( LAL )

#### 2.1 Prueba en conejos

La prueba en conejos 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, de tal manera que la dosis umbral de endotoxina que existe para provocar una reacción pirogénica es igual tanto en el hombre como en el conejo por las características dadas. <sup>(7)</sup>

En los inicios del uso de productos parenterales y terapias intravenosas, Florence Seibert observó que enseguida de la aplicación de estos productos, se presentaba fiebre y otros efectos colaterales peligrosos, debido a la presencia en dichos productos 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 implemento el sistema de 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. <sup>(7,8)</sup>

Los conejos de prueba deben ser preferentemente de la misma variedad, mismo sexo, adultos jóvenes, sanos, de un peso no mayor a 1.500 kg, 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 ° C a 23 ° C, con una variación de  $\pm 3$  ° C de la seleccionada, sin ruido o factores que exciten a los animales. <sup>(8)</sup>

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

Antes de usar los animales por primera vez, o cuando no se han usado durante 2 semanas, controlar su temperatura durante 3 días consecutivos antes de la prueba, realizando todos los pasos de una determinación de pirógenos. <sup>(20)</sup>

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

A partir de la temperatura testigo para cada conejo, se calculan los incrementos obtenidos después de la inyección. Cuando se presente una disminución de temperatura, se considera un incremento de 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 o dos animales muestran un aumento de temperatura de 0.6 °C o más, o si la suma del incremento mayor de los tres conejos excede de 1.4 °C, repetir la prueba usando 5 conejos más. 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.<sup>(9,10)</sup>

En 1942 este método es adoptado por la United States Pharmacopoeia (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 bioterio con cierto número de conejos bajo condiciones específicas de alimentación, temperatura, humedad, de contar con veterinarios 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 hrs. Otra limitación es la variación de sensibilidad de una colonia a otra, dando como resultado falsos negativos. Esta prueba detecta el rango de 0.55 a 3.5 ng/ml/ Kg. de endotoxina.

## **2.2 Prueba de lisado de amebocitos de limulus (LAL)**

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 y cuantifica endotoxina pirogénica y que se basa en la capacidad que tiene 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 son fósiles vivientes de aproximadamente 300 millones de años; éstos son encontrados en aguas litorales de 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 Chiconteagur, Virginia.

El cangrejo cacerola posee un sistema primitivo de gelificación sanguínea como mecanismo de defensa contra bacterias Gram-Negativas. Se observó que cuando el cangrejo es herido esta dispuesto a la invasión de endotoxinas o bacterias, ya que sus células sanguíneas o amebocitos, se agregan para formar una malla, encima de la cual se forma el gel proteínico.

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 la enfermedad se debía a endotoxinas; y para 1956 iniciaron el estudio a fondo de esta enfermedad. Doce años después llegaron a la conclusión de que la reacción de gelificación es de tipo enzimático ya que se lleva a cabo entre las proteínas coagulables de los amebocitos circulantes del cangrejo y de las endotoxinas de esta forma son ellos los primeros en observar que en presencia de pequeñas cantidades de endotoxinas del orden de nanogramos; existe la presencia de la reacción de gelificación in vitro.<sup>(7,10,11)</sup>

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 de tapón de gel, método turbidimétrico y método cromogénico. Tal como se muestran en la figura 5.

El método turbidimétrico es un método de cuantificación; que va detectando diferentes concentraciones de endotoxina 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 (por espectrofotométrica) contra el tiempo y solo necesita 0.1 ml del reactivo y 0.4 ml de muestra. Detecta desde 0.1 - 1.0 EU/ml ó 0.01 - 100 EU/ml.

El método cromogénico es similar a la turbidimétrica, pero en esta técnica el desarrollo de color va siendo monitoreado; la detección de este método es de 0.005 EU/ml. A la mezcla de reacción se le adiciona un sustrato sintético, el sustrato tiene una región terminal con el aminoácido como el de la gelificación, pero aquí hay un desarrollo de color amarillo que es medido en un espectrofotómetro.

Y por último el método de tapón de gel, se forma mediante una reacción enzimática donde la enzima activada (coagulasa), hidroliza los enlaces específicos de la proteína presente en el lisado de amebocitos de limulus (coagulogeno) dando resultado a la coagulina que forma una pasta gelatinosa que indica la presencia de endotoxina. Este método fue el seleccionado para el análisis de endotoxinas en los productos oncológicos por el fácil manejo y el costo, ya que los otros métodos requieren de reactivos y equipo más especializados.



**FIGURA 5. METODOS DE DETECCION DE ENDOTOXINA**

### 2.2.1. FUNDAMENTO BIOQUIMICO DE LA PRUEBA DE LIMULUS (LAL)

Como ya se mencionó, la reacción de gelificación que se efectúa entre las proteínas coagulables de los Amebocitos circulantes del cangrejo *Limulus* y la endotoxina (pirógeno), es de tipo enzimático. Esta reacción es muy semejante a la reacción de coagulación sanguínea en los primates y animales superiores.

### 2.2.2. MECANISMO DE REACCION DE LA PRUEBA

El análisis del Lisado indica que se necesitan cuatro sustancias para que se lleve a cabo la reacción de coagulación del Lisado; tres de ellas son: *La Enzima-Procoagulante* que es la fracción de peso molecular alto y sensible al calor; *las Proteínas coagulables (Coagulógenos)*, siendo la fracción más estable al calor y de bajo peso molecular; y *los Cationes divalentes (Ca<sup>++</sup>)*. Todo este proceso se inicia con la presencia de endotoxinas de las bacterias Gram - Negativas.

Este mecanismo de reacción implica que la Proenzima o Enzima Procoagulante se activa por presencia de endotoxina y por Ca<sup>++</sup>. (Esto se observa en la figura 6). Donde la enzima activada cataliza el desdoblamiento del coagulógeno en subunidades de polipéptidos. La naturaleza química del coagulógeno y sus subunidades coagulantes fueron estudiadas en el *Limulus polyphemus* y el *Tachypicus tridentatus* (una especie parecida al cangrejo cacerola que fué encontrada en el mar de Japón y que tiene la misma reacción que el *Limulus* con las endotoxinas).

En estos estudios, las subunidades del Coagulógeno se denominaron cadenas "A, B, C" de las cuales las cadenas "A" y "B" están unidas por enlaces de Bisulfuro formando el coágulo y la cadena "C" de la porción interna de la molécula madre, no está incorporada al coágulo.

En el *Limulus* el coagulógeno es un polipéptido que está compuesto de aproximadamente 215 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 19 000 a 25 000 Daltons.

La coagulación ocurre dando como resultado 2 fracciones :

- Una fracción de proteínas solubles que son Péptidos de 45 aminoácidos del grupo carboxílico final de la cadena, siendo este el Péptido "C".

- Una fracción de proteínas Péptido insoluble de aproximadamente 145 residuos de aminoácidos, llamada Coagulina. Estos residuos de aminoácidos interactúan entre sí por atracciones Hidrofilicas e Hidrofóbicas que químicamente forman enlaces de bisulfuro cruzados, para dar lugar a la polimerización de los residuos y en consecuencia la formación del coágulo. <sup>(13, 10, 7)</sup>

El coágulo está constituido de fibras muy finas de 50 a 100 micras de diámetro.

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.

El mecanismo por el cual se produce la división del coagulógeno, es similar al de la Tripsina hidrolasa de la Serina, donde el Disopropilfluorofosfato e inhibidores de la Serina también inhiben la reacción de gelificación de la prueba LAL. <sup>(14)</sup>

De lo anterior, se deduce que esta prueba, no es recomendable para detectar endotoxinas en sangre o sus derivados, tales como suero y plasma, porque pueden contener factores de coagulación activados que puedan dar resultados positivos aún en ausencia de endotoxinas.

Así también, las soluciones inyectables que contienen agentes quelantes como el EDTA que complejan los cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{++}$  inhiben la reacción y para poder efectuar la prueba en ellas será necesario añadir una fuente de  $\text{Ca}^{++}$  libre de pirógenos.

La proenzima coagulante es activada en presencia de  $\text{Ca}^{++}$  y Endotoxina

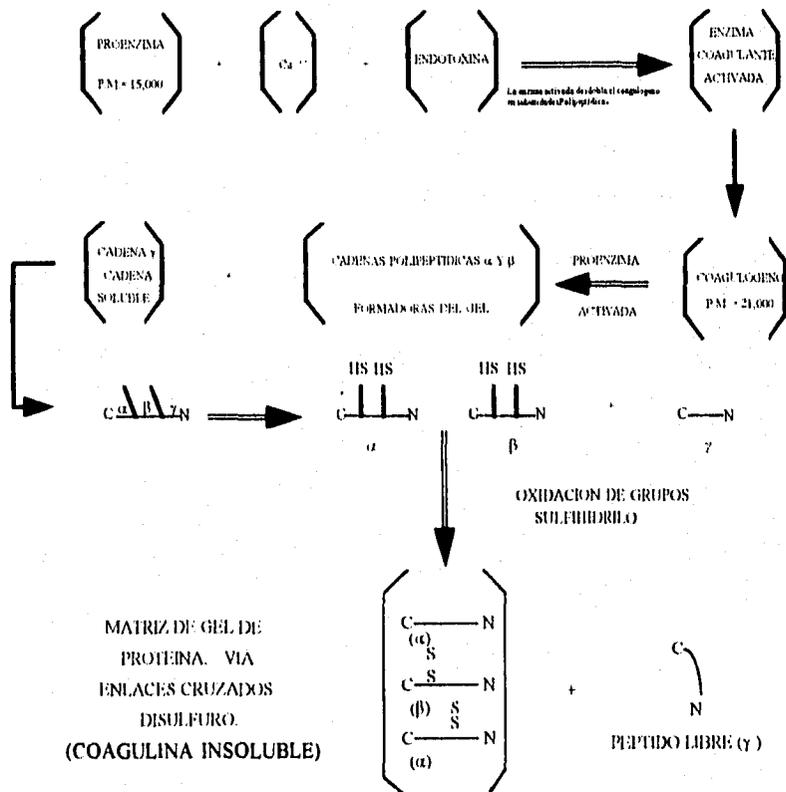


FIGURA 6. REACCION DE GELIFICACION

### 3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE LIMULUS

La importancia de la prueba de Limulus radica en que representa un gran avance en el campo de detección de pirógenos, ya que es una prueba simple, rápida, efectiva y confiable.

	<b>PRUEBA DE LIMULUS</b>	<b>PRUEBA EN CONEJOS</b>
<b>SENSIBILIDAD</b>	Detecta desde 0.01 ng / ml	Detecta desde 0.55 - 3.5 ng/ml/kg.
<b>TIEMPO</b>	1.0 hora de análisis	3.5 horas de análisis mínimo
<b>VARIACIONES BIOLOGICAS</b>	El reactivo estandarizado elimina las variaciones	Puede haber variaciones biológicas
<b>PRODUCTOS TOXICOS</b>	Puede usarse para productos tóxicos	No pueden ser aprobados por ellos
<b>ANALISIS DE PIROGENOS EN SANGRE, SUERO Y PLASMA</b>	No se puede detectar	Si 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.

CUADRO 1 : Ventajas y desventajas de la prueba de Limulus.

## B. VALIDACION

En los últimos años la validación de métodos analíticos ha adquirido gran importancia en la Industria Farmacéutica, es por ello que esta especialmente interesada en la validación de métodos analíticos, debido al gran incremento de nuevos productos que tienen que ver con la salud y que requieren de métodos de análisis apropiados.

En la actualidad se han desarrollado una serie de procedimientos que permiten validar el método, como un aspecto importante en la filosofía de cualquier sistema de calidad de una empresa: "ASEGURAR LA CALIDAD DE UN PRODUCTO".

El término validación hace su aparición como un movimiento más de la actividad de calidad.

Tomando como idea su principio, se puede establecer que la validación de métodos analíticos es un proceso documentado que permite demostrar que este cumple con su propósito, por lo tanto, la importancia reside en determinar la confiabilidad de la metodología. <sup>(15)</sup>

Por definición se dice que *Validación* es el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. <sup>(16)</sup>

La validación es uno de los objetivos de las normas de G.M.P. y también es un objetivo de la Secretaría de Salud; en México se está convirtiendo ya en un requisito reglamentado por esta entidad.

Desde 1973, se ha probado que LAL es un indicador muy sensible a la presencia de endotoxina bacteriana (pirógenos). Debido a su sensibilidad ya demostrada.

En 1980, la United States Food and Drug Administration (F.D.A.) 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 inyectables tanto en humanos como en animales. <sup>(17)</sup>

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 en conejo. <sup>(17,18)</sup>

En diciembre de 1987, la United States Food and Drug Administration ( F.D.A. ), publicó la Guía de validación de la prueba LAL como análisis de endotoxinas en productos terminados para medicamentos de aplicación parenteral y equipos médicos. Los esfuerzos de la validación están enfocados hacia la seguridad, reproducibilidad y eficacia de procesos.

En 1995 la *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* ( F.E.U.M. 6ª Edición) ha aceptado para cada monografía individual los límites específicos de endotoxina.

La FDA ha aceptado los límites de endotoxina en las monografías individuales descritas en la USP para varios preparados farmacéuticos, incluyendo agua y radiofarmacéuticos. Por lo que se ha establecido que el límite máximo de Endotoxina (K) expuesto por hora es de 5.0 EU / Peso o 350.0 EU / Total en el cuerpo, y en preparaciones Intratecales en un Límite máximo de 0.2 EU /Kg o 14.0 EU / total en el cuerpo. <sup>(9)</sup>

El límite máximo para cada preparación farmacéutica recomendado en dosis humana o dosis en conejo está especificado por la monografía como pirógenos. <sup>(9)</sup> Para demostrar que el método empleado cumple con los requisitos especificados, para que funcione como tal, se procedió a validar la técnica, siendo el método empleado el de " Tapón de Gel ". Dicho método incluye las etapas que a continuación se describen:

- a. Confirmación de la sensibilidad del reactivo.
- b. Determinación de la potencia de endotoxina.
- c. Prueba de compatibilidad / Inhibición.
- d. Determinación teórica de la Máxima Dilución Válida (MVD)
- e. Reproducibilidad del método .

**a. Sensibilidad. (  $\lambda$  )**

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 el área de sensibilidad; algunas marcas de Lisado forman un gel firme en presencia de únicamente 0.04 ng. de endotoxina /ml., pero otras marcas necesitan por lo menos 0.4 ng. Por lo que es necesario checar la sensibilidad, para corroborar que realmente detecte la cantidad de Endotoxina necesaria, para algún producto en específico. El proveedor elegido fue Mallinckrodt S.A.

El tiempo de gelificación se define como: el 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.<sup>(19, 20)</sup>

Se entiende por gel firme, un gel capaz de mantener su integridad con el tubo de ensayo en posición invertida o girado a 180 ° C.<sup>(19)</sup>

**b). Potencia**

Para confirmar la potencia de la Endotoxina se requiere un análisis del proveedor. Esta situación hará que la Endotoxina de control estándar ( C S E ) sea estandarizada contra un estándar de Endotoxina de Referencia ( R S E ) y se incluirá el resultado de la potencia estandarizada. La potencia se expresa en EU / ng.

**Control estándar de endotoxina ( C S E ).** Preparación de endotoxina de *Escherichia Coli* caracterizada y estandarizada contra la endotoxina estándar de referencia. Se emplea en la preparación de controles positivos y en las soluciones estándar de endotoxinas, para verificar la sensibilidad del lisado de amebocitos de *Limulus*.

**Endotoxina de Referencia ( R S E ).** Es la endotoxina de referencia, la cual tiene una potencia definida en unidades de endotoxina (EU) por vial.<sup>(20)</sup>

Una EU es la actividad en un peso definido de la Endotoxina Estándar USP; así por definición 1 EU = 0.2 ng de la Endotoxina Estándar USP Lote EC-2.<sup>(19)</sup>

**c). Concentración no Inhibitoria**

La concentración no inhibitoria experimental, es la concentración de producto a la cual la prueba de LAL no es inhibida ni favorecida; por lo tanto a esta concentración no habrá resultados falsos positivos ó falsos negativos.

**d). La Máxima Dilución Válida**

La Máxima Dilución Válida ( M.V.D.), es la máxima dilución permitida que se le puede hacer al producto para realizar pruebas de compatibilidad con el reactivo LAI., ya que ésta sirve para seleccionar diluciones de prueba que no excedan la concentración que pueda inhibir la concentración experimental para drogas administradas en EU / kg.

### **C. PRODUCTOS ONCOLOGICOS O ANTINEOPLASICOS**

El Cáncer no es una enfermedad específica, sino que engloba una serie de alteraciones en el funcionamiento y control del metabolismo además de la fisiología celular, principalmente en aspectos de reproducción y proliferación. <sup>(1)</sup>

Las causas del cáncer son muy variadas, tanto como el tipo de tumor o neoplasia que llegan a producir.

Una neoplasia es un crecimiento de tejido relativamente incontrolado. Los tumores humanos espontáneos constituyen el objeto final de la investigación oncológica básica.

La mayoría de las neoplasias puede dividirse en dos tipos principales:

**1) Tumores benignos no invasivos y no metastásicos**

Los tumores benignos se caracterizan por poseer una estructura que a menudo es la típica del tejido de origen, son tumores bien diferenciados y que crecen lentamente.

**2) Tumores malignos ó metastásicos**

Los tumores malignos son generalmente, indiferenciados y constan de un gran porcentaje de células en fase de división.

La metástasis se define como la transición de la enfermedad de un órgano o una parte de él, a otro no directamente conectado con él. Esta puede ser debido a la transmisión de microorganismos patógenos o bien la transmisión de células como tumores malignos. La capacidad de invadir y propagar es la única característica propia de las neoplasias malignas.

El proceso metastásico comprende la liberación de células del tumor primario, la diseminación a zonas distantes, la detención a nivel de la microcirculación de los órganos, así como la supervivencia y crecimiento de dichas colonias en el nuevo tumor. El resultado de estos procesos, depende de factores propios del huésped y de las propiedades celulares del tumor. Por lo, tanto el desarrollo metastásico es un proceso complejo altamente selectivo que comprende la interrelación entre las propiedades de las células tumorales y las propiedades del huésped. <sup>(2)</sup>

La muerte de los pacientes, en el pasado se consideraba como una consecuencia directa del cáncer, sin embargo con la aparición de la quimioterapia; la esperanza de vida y curación aumentó..

Dado que la mayor parte de tumores se forman a partir de una célula única como resultado de una mutación espontánea, por la exposición a un virus oncógeno o un agente químico carcinógeno, expandiéndose hasta un nivel que puede ser detectable. La capacidad de curar el cáncer depende de numerosas variables; siendo la más importante la presencia de metástasis viables. La necesidad de la quimioterapia surgió de la observación del cáncer que es raramente un proceso localizado y es no controlable con métodos locales; por lo que la quimioterapia del cáncer es el tratamiento de las metástasis

La idea de que los fármacos pudieran ser útiles para tratar el cáncer recibió gran ímpetu a partir del uso de fármacos sintéticos y productos naturales para curar infecciones bacterianas comunes y tuberculosis tanto en roedores como en el hombre.

Erhlich, considerado el padre de la quimioterapia, se dedicó a trabajar sobre el problema del cáncer, y en 1898 descubrió el primer agente alquilante, que 50 años después de su observación este agente se aplicó al tratamiento de las enfermedades neoplásicas del hombre.<sup>(17)</sup>

Todos los fármacos antineoplásicos son citotóxicos (venenos celulares) ya que afectan el desarrollo tanto de las células normales como el de las neoplásicas. Sin embargo, dado que las células neoplásicas son mucho más efectivas y se multiplican con mayor rapidez que las normales, también son más susceptibles.<sup>(11, 23)</sup> Por lo que, las células que están en etapa mitótica de proliferación están más propensas a reaccionar con este tipo de fármacos.

Además de sus propiedades citotóxicas, éstos son potencialmente mutagénicos y teratogénicos, ya que poseen propiedades inmunodepresoras, las cuales afectan las respuestas inmunológicas, tales como la producción de anticuerpos, reacción inflamatoria y el funcionamiento de la fagocitosis.<sup>(22)</sup>

La toxicidad de los oncológicos también se manifiesta en el revestimiento del tracto gastrointestinal; las úlceras orales, el sangrado intestinal y la diarrea son signos de una toxicidad excesiva.

Los antineoplásicos pueden clasificarse en varias categorías de acuerdo a su mecanismo celular .

1. Alquilantes: Se cree que estos medicamentos se unen al ácido nucleico dentro del núcleo de la célula afectando la mitosis (división celular), como ejemplo están las mostazas nitrogenadas.

2. Antimetabolitos: Estos medicamentos afectan procesos importantes del metabolismo celular. Algunos de ellos son tan parecidos a metabolitos celulares necesarios que la célula incorpora como error, pero al no poder usarlos todo el mecanismo de la división celular se detiene. Dentro de este grupo están los análogos del ácido Fólico, como el Metotrexato; análogos de purinas.<sup>(23)</sup>

3. Productos naturales: A pesar de que también afectan la división celular, ciertas sustancias naturales (alcaloides y antibióticos) han demostrado ser útiles como antineoplásicos.

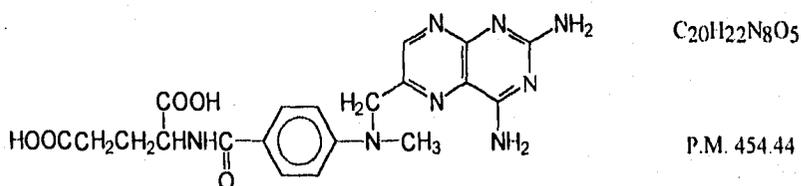
4. Hormonas: En especial las sexuales, se emplean en algunas neoplasias.

5. Isótopos radiactivos: El Fósforo, Yodo y Oro radiactivos son efectivos contra determinadas formas de cáncer. Estos medicamentos destruyen el tumor mediante irradiación.<sup>(23)</sup>

Como se puede apreciar la utilidad de estos medicamentos es muy amplia, tanto como lo es la responsabilidad de todas las personas involucradas en la producción, acondicionamiento y control de calidad de los productos así como en la administración de ellos a los pacientes.

La mayoría de estos medicamentos se emplean exclusivamente para enfermedades neoplásicas, como es el caso del Cisplatino y Metotrexato que se mencionan a continuación.

## I. METOTREXATO



Amoteprina; Ácido N- ( 4- ( 8,2,4 diamino -6- pteridine ) metil - metilamino ) benzoil ) L- glutámico; Metotrexato; Methopterina; 4-amino-4-dioxy-10-metilpteroil- L-glutámico ácido; 4-amino-10-metil ácido fólico.<sup>(22)</sup>

### *DESCRIPCION:*

Polvo cristalino de color amarillo naranja. Fácilmente soluble en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos y carbonatos, ligeramente soluble en solución 6.0 N de HCl, casi insoluble en agua, etanol, éter y cloroformo. <sup>(19)</sup>

Es un teratogénico en humanos y animales de laboratorio y pueden afectar sangre , hígado y otros órganos.

Es un antagonista del Acido Fólico. Afecta la formación de DNA Encontrándose así en el grupo de los llamados Antimetabolitos.

Los Antimetabolitos son agentes que gracias a su similitud estructural con sustancias del metabolismo intermediario fisiológico utilizan como substratos en reacciones químicas vitales, interfiriendo de este modo con el metabolismo celular. <sup>(22)</sup>

### *MECANISMO DE ACCIÓN:*

El Metotrexato ejerce su efecto Citotóxico a través de la acción enzimática Dihidrofólica reductasa. Esta enzima es la responsable del mantenimiento de la unión intracelular de folatos en estado reducido, y a su vez tetrahidrofolatos actúan como transportadores de grupos monocarbonados requeridos para la síntesis de nucleótidos de purina y timidilato.

El Metotrexato provoca a través de la inhibición de la reductasa una acumulación de folatos celulares en su forma inactiva oxidada y un bloqueo de la síntesis primero de Timidilato y luego de los nucleótidos de purina. La inhibición de la síntesis de Timidilato parece ser más sensible a la depresión de folatos reducidos.

La muerte celular se produce con mayor eficacia a dosis elevadas, probablemente debido a la mayor letalidad de los efectos antipurínicos.

El Metotrexato entra en las células por un mecanismo de transporte activo compartiendo con los folatos reducidos fisiológicos, y alcanza las concentraciones de equilibrio en prácticamente todas las células en menos de 30 minutos. El Metotrexato es transformado en poliglutamato mediante un proceso análogo a la poliglutamación de los folatos fisiológicos.

#### *USOS:*

Como tratamiento se usa en Cariocarcinoma Uterino, Linfoma, Leucemia Linfoblástica aguda, Leucemia Meningea y otras neoplasias diseminadas en los niños, se ha observado que al emplearlo en la quimioterapia en tumores de cabeza y cuello hay un efecto positivo. También es un inmunodepresor en trasplante renal, y como medicamento de investigación de Lupus Eritematoso Sistémico y Artritis Reumatoide. Antes de iniciar el tratamiento, se recomienda realizar pruebas de función renal y durante el tratamiento debe determinarse diariamente el conteo de Leucocitos. (17)

#### *REACCIONES ADVERSAS:*

El Metotrexato tiene un margen estrecho sobre los efectos terapéuticos deseados y las reacciones de toxicidad. Los efectos colaterales más graves son la deficiencia de Acido Fólico y la depresión de la médula ósea.

#### *DOSIFICACION:*

El Metotrexato sódico se administra por vía Intravenosa, vía Intramuscular, Intratecal o Intra-arterial. La dosis individualizada en Cariocarcinoma, es de 15-20 mg/día durante 5 días y se puede repetir de 3 a 5 veces, con periodos de reposo de una semana entre cada tratamiento. En Leucemia se inicia de 3.3 mg/m<sup>2</sup> ( con 60 mg de prednisona diarios por m<sup>2</sup> ). En Leucemia Meningea se administra Intratecalmente de 0.2 a 0.5 mg/kg cada 2 a 5 días. (18)

**PRECAUCIONES:**

Se debe tener cuidado especial al manejarlo ya que es tóxico, evitar el contacto directo con la piel, así como inhalar el polvo contenido en su envase. Todas las operaciones relacionadas con el análisis deben efectuarse en una campana de extracción restringiendo el acceso al personal ajeno. Los guantes y mascarillas utilizadas al terminar las pruebas deben incinerarse al igual que los desechos de análisis. <sup>(23)</sup>

**DESTRUCCION:**

El Metotrexato es destruido por oxidación con  $\text{KMnO}_4$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , con  $\text{KMnO}_4$  alcalino, e Hipoclorito de Sodio. La destrucción es mayor del 99.5 % en todos los casos. A continuación se describen más detalladamente cada uno de los métodos:

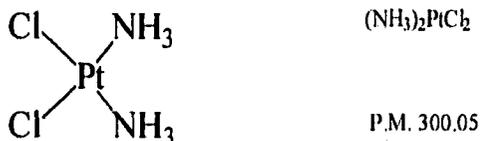
**A).** Diluir con una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3.0 Molar, no excediendo la concentración de 5.0 mg/ml, después adicionar 0.500 gr.  $\text{KMnO}_4$  por cada 10.0 ml de solución, agitar 1.0 h, decolorar, neutralizar con Acido Ascórbico y descartar.

**B).** Disolver en una solución de NaOH 1.0 Molar, cuidando no exceder la concentración de 1.0 mg/ml. Por cada 50.0 ml de esta solución, adicionar 5.50 ml. de una solución acuosa de  $\text{KMnO}_4$  1.0 % y agitar. Si el color púrpura permanece por más de 30 minutos, adicionar más solución de  $\text{KMnO}_4$ ; después decolorar la mezcla con solución 0.1 Molar de Bisulfito de Sodio para neutralizar y descartar.

**C).** Disolver en una solución de NaOH 1.0 Molar, no excediendo la concentración de 0.500 mg/ml. Para cada 100 ml de esta solución adicionar 10 ml de solución 5.25 % de Hipoclorito de Sodio y agitar por 30 min. A esta mezcla remover el exceso de Oxidante, neutralizar con HCl 0.1 Molar, destruir y descartar. <sup>(21, 24)</sup>

El método que se siguió para destruir los desechos de los análisis del Metotrexato fue el que se indica en el inciso A.

## 2. CISPLATINO



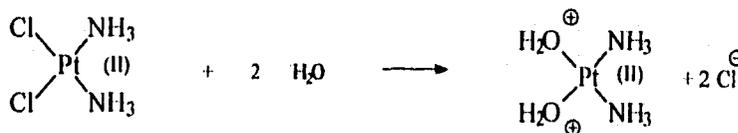
Cisplatino; CIS-DDP; Platino Diaminodicloro; Citotrexato; Cis-diaminodicloroplatino.

### DESCRIPCION

Cis-diaminodicloroplatino es un complejo de metal pesado que contiene un átomo central de platino rodeado por dos átomos de cloro y dos moléculas de amonio en posición CIS. EL Cis (II) platino diaminodicloro ( CIS - DDP ), es el único compuesto con un metal pesado, de uso común en terapia antihumoral, por tanto, posee un mecanismo de acción y un espectro de efectos biológicos únicos dentro de este grupo de fármacos ya que está considerado dentro de Agentes Alquilantes. <sup>(16,17)</sup>

Es un polvo liofilizado de color amarillo anaranjado. Soluble en solución salina a 1.0 mg/ml, y en Dimetilformamida, con punto de fusión de 270 °C. <sup>(19)</sup>

La actividad antihumoral del Cis-DDP, se comprende mejor al examinar sus propiedades químicas en solución acuosa, (Figura 7). El platino (Pt), es un metal pesado divalente, que se enlaza con 2 grupos que pueden ser fácilmente liberados, los iones cloruro; en transposición a los grupos cloruro se hallan dos iones NH<sub>3</sub> firmemente unidos por un enlace covalente. Sólo la estructura Cis-dicloro posee actividad antihumoral. El isómero Trans-DDP carece de actividad citotóxica, posiblemente por su incapacidad para formar enlaces dentro de las cadenas DNA. Los dos iones cloruro experimentan un lento desplazamiento por el agua, proceso que puede acelerarse en ambientes con concentraciones bajas de cloruro (por ejemplo en el interior de la célula), generando un compuesto hidratado cargado positivamente. <sup>(28)</sup>



**Figura 7 . Cis - Diaminodicloroplatino: Formación de Complejos reactivo en solución acuosa.**

Estos compuestos activados pueden reaccionar con los puntos nucleofílicos del DNA, RNA o proteínas para formar enlaces covalentes bifuncionales semejantes a las reacciones Alquilantes.

Las consecuencias de la acción del Cis - DDP sobre el DNA incluyen cambios de conformación del DNA e inhibición de la síntesis del mismo. La formación de enlaces es un proceso lento que continua horas después de la exposición al fármaco y se opone a los procesos de reparación, que separan y reconstruyen los segmentos de DNA dañados.

Parece que algunas células son más sensibles a este fármaco si se exponen durante la fase G<sub>1</sub> (intermitótica), posiblemente por el retraso en la formación de enlaces. <sup>(17)</sup>

#### *ACCION*

Cis-DDP, tiene propiedades bioquímicas similares a la de los agentes Alquilantes bifuncionales que producen uniones cruzados entre las cadenas del DNA. Después de la aplicación de una dosis única por vía intravenosa, el Cis-diclorodiamino platino en animales y humanos, se concentra en hígado, riñones, intestino delgado y grueso. Aparentemente tiene pobre penetración en sistema nervioso central.

La vida media plasmática post-distribución es de 58 a 73 h, durante esta fase, más del 90 % de radioactividad en la sangre está ligada a las proteínas. El Cis-diclorodiamino platino se excreta principalmente por la orina del 20 al 75 % en las primeras 24 h después de la administración. <sup>(16,17)</sup>

#### *USOS*

Tratamiento paliativo de tumores testiculares y ováricos metastásicos, en combinación con otros medicamentos, o que han recibido anteriormente procedimientos quirúrgicos y/o radioterapéuticos apropiados. También en terapia de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

En cáncer avanzado de vejiga, el cis-diclorodiamino platino se indica como único medicamento, y también responde a tratamientos locales tales como cirugía o radioterapia en el mismo. <sup>(17)</sup>

#### *ADMINISTRACION CLINICA Y TOXICIDAD*

El método de administración clínica del Cis-DDP viene determinado por sus principales efectos tóxicos. Dado su potencial de nefrotoxicidad, el Cis-DDP se administra normalmente después de un periodo de hidratación de 4 a 6 h con 1.0 litro de líquido y de 25 a 50 gr. de Manitol. La dosis total a administrar varía normalmente entre 40 y 120 mg / m<sup>2</sup>. Otra alternativa es administrar 20 mg / m<sup>2</sup> al día durante 5 días, método que causa menos nefrotoxicidad y náuseas.

Está contraindicado en pacientes con función renal disminuida . No debe ser empleado en pacientes mielosuprimidos. <sup>(17)</sup>

#### *PRECAUCIONES*

Se debe tener especial cuidado al manejarlo ya que es tóxico, evitar el contacto directo con la piel, así como inhalar el polvo contenido en sus envases. Todas las operaciones relacionadas con el análisis deben efectuarse en una campana de extracción restringiendo el acceso al personal ajeno. Los guantes y mascarillas utilizadas al realizar las pruebas deben incinerarse igual que los desechos de análisis. <sup>(20)</sup>

#### *DESTRUCCION*

La degradación de un gran número de fármacos antineoplásicos, incluyendo Cisplatino y Metotrexato, fue investigado por la Internacional Agency for Research on Cáncer (IARC).

El Cisplatino puede ser destruido por reducción del elemento Platino con Zinc (99 % de destrucción), o por formación de un complejo inactivo con Dietildiotiocarbamato. Con dichas soluciones las muestras formadas no fueron mutagénicas; pero con la oxidación del Cisplatino con KMnO<sub>4</sub>, se encontró que daba residuos mutagénicos, por lo que no es recomendable. <sup>(14)</sup>

**A)** Disolver el Cisplatino en solución de Acido Sulfúrico 2 Molar. Agitar la mezcla y adicionar 3.0 gramos de Zinc en polvo para completar la destrucción, neutralizar y desechar.

**B)** Disolver el Cisplatino en agua; por cada 100 mg. de Cisplatino, adicionar 30.0 ml de solución de Dietildiotiocarbamato 0.68 M en NaOH 0.1 M. Adicionar 30 ml de solución saturada de Nitrato de Sodio (formando un precipitado amarillo), y desechar. <sup>(14,25)</sup>

Para la destrucción del análisis del Cisplatino se realizó el método del inciso A.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los productos farmacéuticos estériles, deben poseer características únicas, tales como encontrarse libre de microorganismos, pirógenos, partículas y cualquier otra sustancia que represente una 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 considera, un factor crítico en la manufactura de estos productos, ya que pueden producir fiebre, shock y hasta la muerte

Ante esto en el presente proyecto se pretende establecer la seguridad de que el método empleado para cuantificar la cantidad de endotoxinas bacterianas en un producto farmacéutico oncológico estéril, cumpla con la función para lo cual está diseñado, es decir, se encuentre validado.

Una de las causas o factores por lo que se pretende la validación del método para determinar endotoxinas bacterianas con reactivo LAL en productos Oncológicos, es que éstos son citotóxicos, lo que involucraría un mayor uso de conejos y por consiguiente un mayor costo, además de que estos animales no servirían para pruebas subsecuentes por la toxicidad de dichos productos.

Otra de las ventajas del reactivo LAL es que este se puede manejar a una sensibilidad tan baja, en el orden de nanogramos, que al ser evaluado se pueden detectar cantidades muy pequeñas de endotoxina in vitro, en comparación con el método in vivo ya que tiene mayor sensibilidad y compatibilidad.

Finalmente, la prueba LAL puede ayudar a obtener productos de mayor calidad, obteniendo beneficios con menos tiempo invertido.

### **III. OBJETIVOS**

#### **GENERALES**

- Establecer un método de detección para la prueba de pirógenos ( Endotoxinas bacterianas ) por el método del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) en los productos Oncológicos Metotrexato y Cisplatino.
- Establecer de manera documentada, que la prueba LAL, para la detección de pirógenos en Metotrexato y Cisplatino es válida, confiable y reproducible, y que puede sustituir a la prueba oficial de detección de pirógenos en conejos.

#### **PARTICULARES**

- Establecer la mínima concentración de validación permitida (M.V.C.) y la máxima dilución permitida (M.D.V.) para cada producto oncológico, Metotrexato y Cisplatino.
- Establecer la concentración no inhibitoria con base a la Mínima Concentración Válida (M.V.C.) y Máxima Dilución Válida (M.V.D.) de los mismos productos.
- Calificar al personal que efectúe la prueba de Lisado de Amebocitos de Limulus.
- Establecer la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

#### ***IV. HIPOTESIS***

La sensibilidad del reactivo LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus) es dependiente de la concentración de endotoxina, por lo que la respuesta de gelificación aumentará conforme aumente la concentración de endotoxina contenida en la muestra; ya que al interaccionar el reactivo Lisado de Amebocitos de Limulus con la muestra, no deberá dar lugar a la reacción de gelificación, lo cual indicará que el producto se encuentran libre de endotoxina.

## **V. EQUIPO Y MATERIAL**

### **A. Material de vidrio**

- Matraces Volumétricos Pyrex de 10, 25, 50 y 100 ml.
- Pipetas Volumétricas Pyrex de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Vasos de Precipitados Pyrex de 10, 50, 100, 400 y 1000 ml.
- Pipetas Graduadas Pyrex de 1, 2, y 5 ml.
- Matraz Erlenmeyer Pyrex de 250 ml.
- Probetas Graduadas de 1000 ml.

### **B. Material Diverso**

- Micropipetas Automáticas de 50, 100, 200 y 1000  $\mu$ l.
- Frascos Viales de 5 y 10 ml
- Gradillas Unicl y Metálica
- Equipo de Seguridad
  - . Mascarilla INFRA mod. II-1050, y Goggles III-PO-72, Guantes Latex
  - . Bata Impermeable, Cubrebocas y Cofia
- Papel Impermeabilizante (Whatman N. 50)
- Paños de algodón
- Termómetros (-10.0 a 110 °C)

**C. Reactivos Biológicos**

- Endotoxina Control Estándar E. Coli 055: B5. 10.0 EU/ng. Mallinckrodt S.A.
- Endotoxina Referencia Estándar E. Coli USP (10,000 EU/vial)
- Lisado de Amebocitos de Limulus. L-3L0775 y L-3L0700, Mallinckrodt S.A.
- Agua Libre de Pirógenos

**D. Reactivos Químicos**

- Hidróxido de Sodio J.T. Baker Q.P.
- Acido Clorhídrico J.T. Baker Q.P.
- Permanganato de Potasio J.T. Baker Q.P.
- Acido Ascórbico J.T. Baker Q.P.
- Zinc en polvo J.T. Baker Q.P.
- Acido Sulfúrico J.T. Baker Q.P.

**E. Productos Oncológicos**

- . Metotrexate 50 mg. Liofilizado L-20339 y L-20340
- . Cisplatino 10 mg. Liofilizado L- 20526

#### ***F. Soluciones***

- Acido Clorhídrico 0.1 N con agua libre de pirógenos
- Hidróxido de Sodio 0.1 N con agua libre de pirógenos
- Acido Sulfúrico 2.0 y 3.0 M.

#### ***G. Instrumental y Equipo***

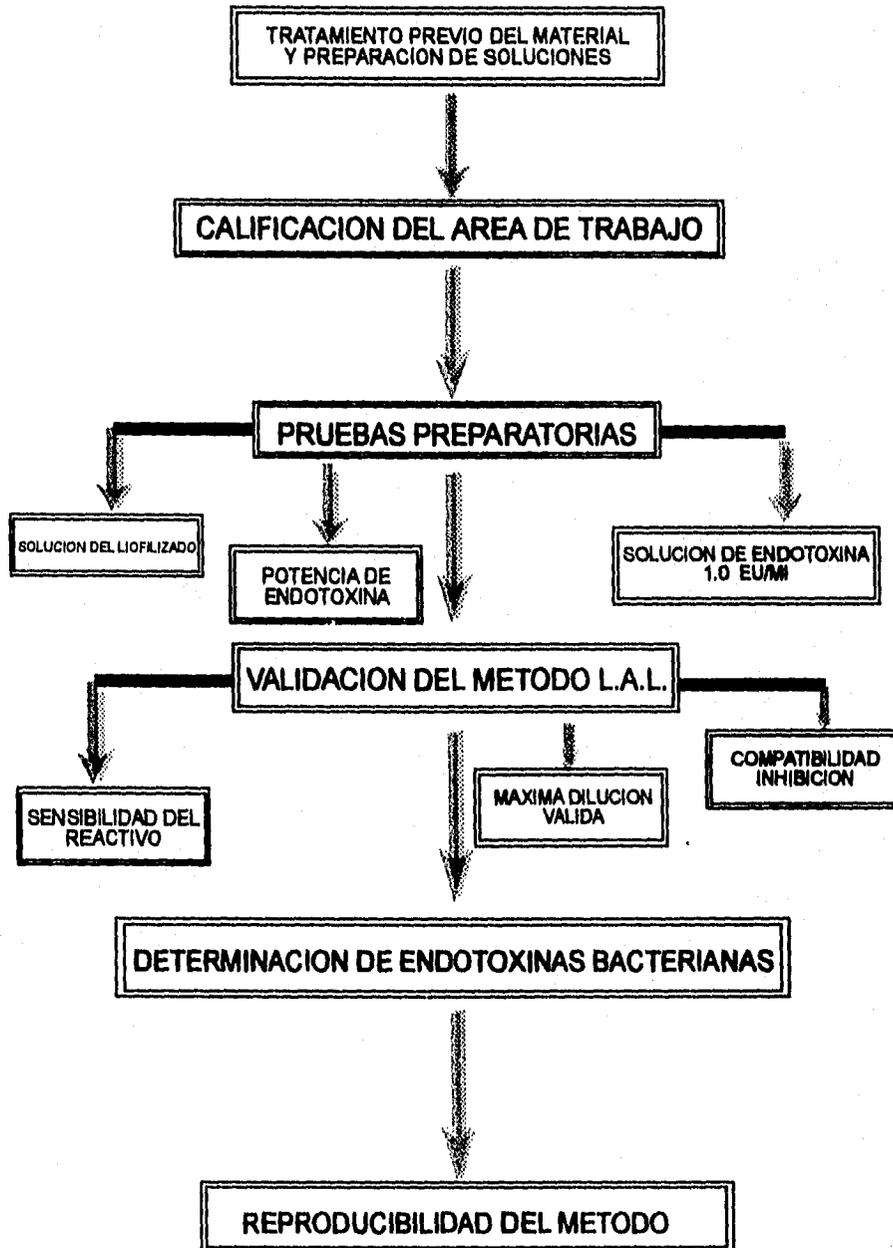
- Balanza analítica Sartorius
- Cronómetro Casio Modelo 210-14
- Termoincubador Modelo 137-455 Serie 0639 37<sup>+</sup>
- Agitador de tubos Tipo Vortex. Modelo 22173

## VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo de este trabajo sobre la detección de endotoxinas bacterianas (pirógenos) "in vitro" con el reactivo LAL (Lisado de Amebocitos de Limulus) se realizó de manera independiente para los siguientes productos Oncológicos; Metotrexato y Cisplatino como producto terminado.

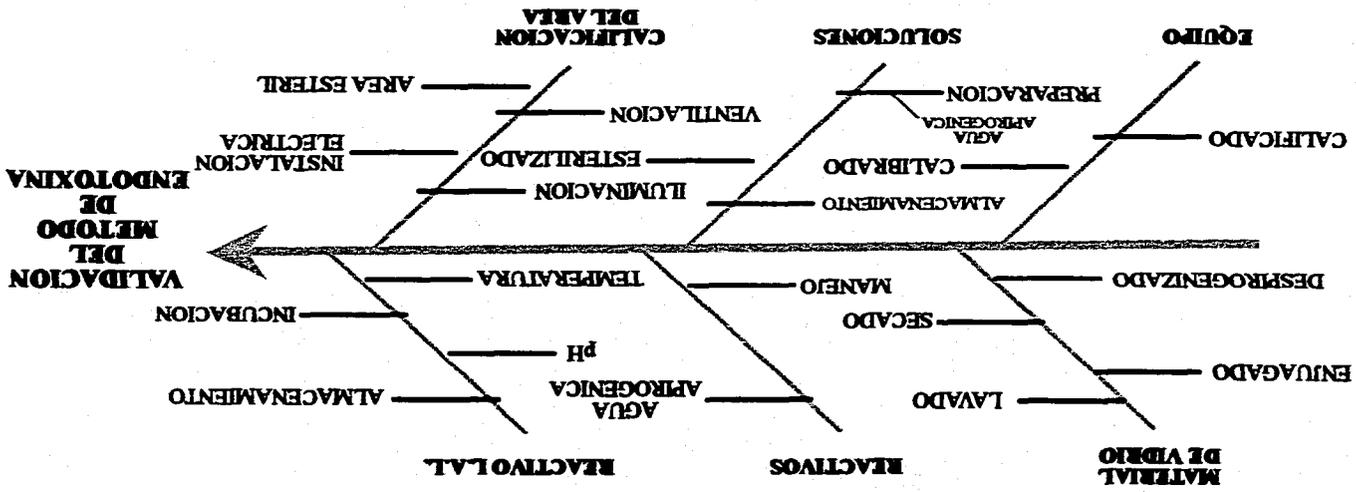
En el siguiente diagrama de bloques (Figura 8), se muestra la metodología seguida en este trabajo comenzando por: el tratamiento previo del material, la preparación tanto de las soluciones libres de pirógenos como de las soluciones inactivadoras, la calificación del área donde se realizarán las pruebas, continuando con las pruebas preparatorias que fueron: la preparación del reactivo de Limulus, la curva estándar de endotoxina 1.0 EU/ml., y la verificación de la potencia. Finalizando con la validación del método donde se calculó la máxima dilución válida, se realizó la sensibilidad del reactivo y la prueba de compatibilidad/inhibición. Terminadas las pruebas anteriores y corroborando que todo estuvo bien se realizó la determinación las endotoxinas bacterianas en cada producto, haciéndose así mismo la prueba de reproducibilidad del método.

En el diagrama Causa-Efecto que se observa en la figura "9" se resumen los factores críticos que se involucran en la técnica del método de endotoxinas para minimizar los posibles errores, para así obtener mejores resultados; entre estos está como deben ser tratados los materiales, reactivos y equipos así como las condiciones más adecuadas.



**FIGURA 8. DIAGRAMA DE LA METODOLOGIA EMPLEADA EN LA DETERMINACION ENDOTOXINAS BACTERIANAS**

FIGURA 9 DIAGRAMA DE CAUSA EFECTO DE LA VALIDACION DEL METODO DE ENDOTOXINAS



## **A. TRATAMIENTO PREVIO DEL MATERIAL Y PREPARACION DE**

### **SOLUCIONES**

#### **1. Lavado del Material**

Se lavó con jabón dextran

Se enjuagó con agua destilada

Se secó completamente en una estufa a 105° C

Se despirogenizó en una estufa a 250 °C durante 30 minutos.

#### **2. Preparación de soluciones**

Hidróxido de Sodio 0.1N . Libre de pirógenos

Se pesaron exactamente 0.400 g. de NaOH grado reactivo, se transfirieron a un matraz aforado de 100 ml, y se aforaron con agua libre de pirógenos. Después se transvasó la solución a un matraz erlenmeyer de 250 ml. con tapón y se esterilizó en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Acido Clorhídrico 0.1 N . Libre de pirógenos

A un matraz aforado de 100 ml conteniendo 50.0 ml de agua libre de pirógenos, se agregaron 8.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se aforaron con agua libre pirógenos. Después se transvasó la solución a un matraz erlenmeyer de 250 ml. con tapón y se esterilizó en una autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

#### Ácido Sulfúrico 2.0 M

A un matraz aforado de 2.0 litros, conteniendo 1.0 litro de agua destilada, se agregaron 220 ml de ácido sulfúrico concentrado y se aforaron con el mismo solvente.

#### Ácido Sulfúrico 3 M

A un matraz aforado de 2.0 litros conteniendo agua destilada, se agregaron 325 ml de ácido sulfúrico concentrado y se aforaron con la misma agua destilada.

## **B. CALIFICACION DEL AREA DE TRABAJO**

La calificación involucra que el área e instalaciones donde se realizó la prueba, se encuentran en las condiciones apropiadas con el objetivo de minimizar el riesgo de exposición de estas sustancias, haciendo así el trabajo más seguro ya que los productos Oncológicos analizados son cancerígenos. Para realizar la calificación del área de trabajo se realizaron las siguientes actividades:

- a) Descripción del área
- b) Instalaciones y servicios
- c) Materiales que estuvieron en contacto con los productos

El área donde se realizaron las pruebas fue el área estéril 2, del departamento de microbiología, porque como son productos estériles deben trabajarse con mucho cuidado, además de que son muy tóxicos, para evitar una posible contaminación. El área cuenta con las siguientes instalaciones y servicios: Un sistema de extracción que cumple con los requerimiento especificados, la instalación eléctrica de 120 V y una campana de flujo laminar tipo horizontal. Entre los materiales que estuvieron en contacto con el producto fueron una pantalla de acrílico vertical; el papel absorbente utilizado para cubrir las partes de la base de la campana por si había derrames de producto fue tipo whatman N° 50 de 100 cm X 50 cm.

## **C. PRUEBAS PREPARATORIAS**

### **1. PREPARACION DEL REACTIVO LIOFILIZADO " LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS "**

- a. Se reconstituyó el frasco vial con 5 ml de agua libre de pirógenos. Agitando suavemente en forma manual, evitando la formación de espuma.
- b. Un vez que se reconstituyó el Lisado se dosificaron con una jeringa estéril de 1.0 ml, cantidades de 0.1 ml en tubos de ensayo ( 50 tubos pyrogent ) de 10 x 75 mm. con tapón de rosca
- c. Se almacenarán a temperatura de congelación de -10 a 0° C hasta su uso<sup>i</sup>

### **2. PREPARACION DE LA CURVA ESTANDAR DE ENDOTOXINA**

#### **1.0 EU/ml**

- a. Se reconstituyó el control de endotoxina con 5.0 ml agua libre de pirógenos.
- b. Se agitarón durante 5 minutos en un agitador vortex.
- c. Se diluyó la endotoxina con agua libre de pirógenos a una concentración de 1.0 EU/ml<sup>ii</sup> Cada dilución se agitó en el vortex durante 60 segundos antes de hacer las diluciones subsquentes tal como se muestran en el esquema "1" de diluciones de endotoxina.

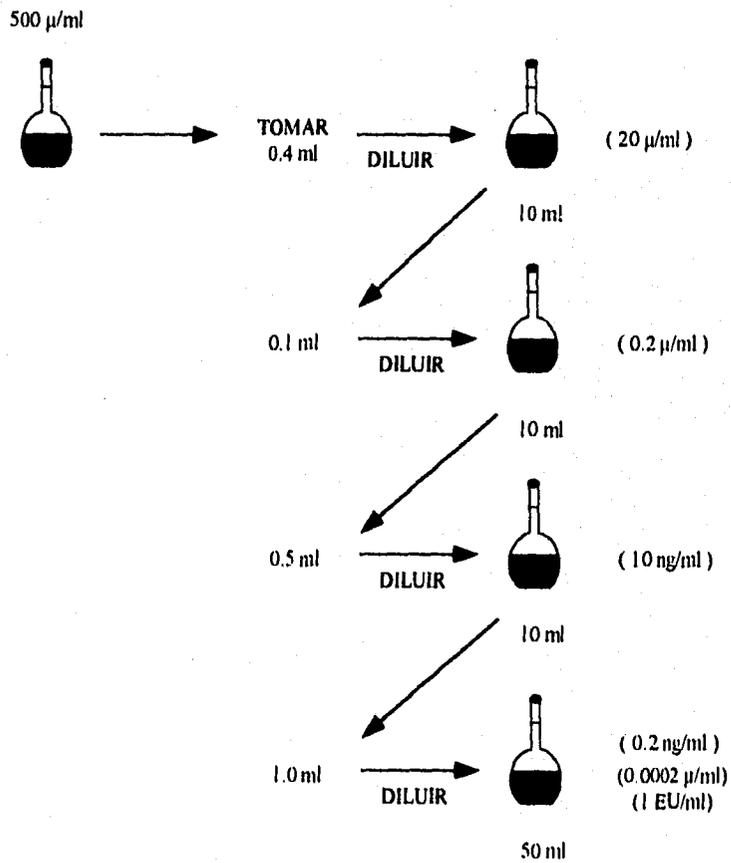
<sup>i</sup> El lisado reconstituido y congelado puede almacenarse hasta 4 semanas.

<sup>ii</sup> Una EU es una unidad de endotoxina y esta equivale a 0.2 ng de endotoxina

# ESQUEMA 1

## DILUCION DE ENDOTOXINA TIPICA 1.0 EU/ml

EL VIAL CONTIENE 500  $\mu$ /ml:  
CUANDO SE RECONSTITUYE CON 5.0 ml DE AGUA



### 3. POTENCIA DE ENDOTOXINA

#### PREPARACION DE LA SOLUCION DE ENDOTOXINA DE REFERENCIA R.S.E.

Del vial RSE Endotoxina USP:

*a)* Se reconstituyó el vial de endotoxina RSE, con 2.0 ml de agua libre de pirógenos, se agitó vigorosamente en el vortex por 5.0 minutos.

*b)* A partir del concentrado, se pasarón 0.1 ml a un matraz aforado de 50 ml. y se diluyeron y aforaron con agua libre de pirógenos.

*c)* De la dilución anterior, se tomó 1.0 ml y se aforó a 10 ml. con agua libre de pirógenos, llegando a una concentración de 1.0 EU / ml.

- Se preparón dos curvas de Endotoxina independientes; una de Endotoxina Control Estándar (CSE) y la otra de Endotoxina Estándar de Referencia (RSE), partiendo de la concentración 1.0 EU /ml. esquema " 2 "

- Se hicieron dos diluciones por arriba y dos por abajo de la sensibilidad central (0.125 EU/ml), se hicieron por cuadruplicado para cada endotoxina y se homogenizarón los tubos suavemente, la reacción de cada replica se llevó a cabo con 0.1 ml de cada una de las diluciones con 0.1 ml del reactivo LAL.

- Se incubaron los tubos en una placa a  $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$  durante 60 minutos.

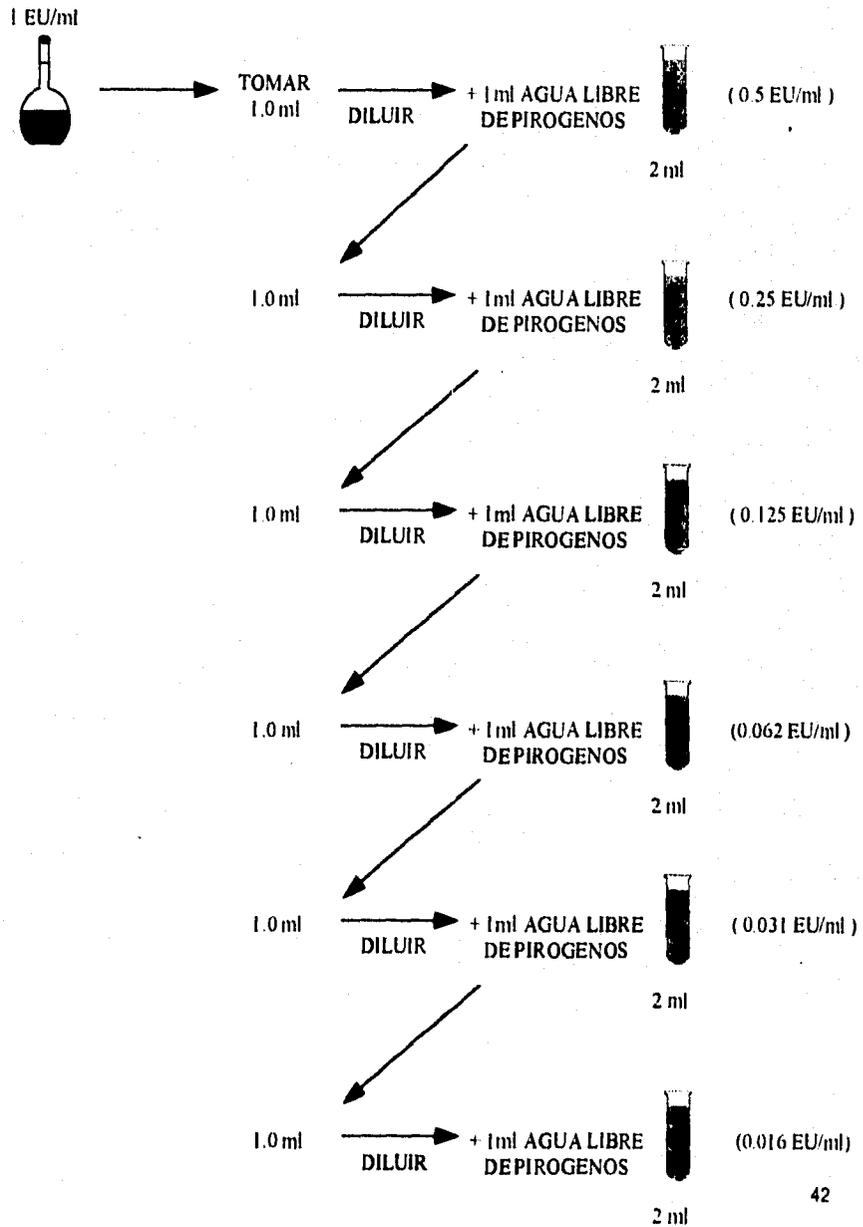
- Al término del tiempo se consideró como punto final a aquella concentración que dió como respuesta positiva la formación de un gel firme.

Una adecuada verificación de la potencia de la Endotoxina Control Estandar es si entra en el rango de 2.0 EU/ml a 10.0 EU/ml

## ESQUEMA 2

## CURVA ESTANDAR

A PARTIR DE LA DILUCION 1.0 EU/ml



## **D. VALIDACION DEL METODO**

### **I. CONFIRMACION DE LA SENSIBILIDAD DEL REACTIVO**

Para realizarse la prueba los analistas se pusieron los uniformes adecuados como son la bata impermeabilizante, dos pares de guantes látex, mascarilla de seguridad, cubrebocas, cofia y goggles.

Una vez que se tuvieron todos los equipos, materiales y soluciones preparados adecuadamente, se procedió a realizar la prueba.

a) A partir de la dilución de 1.0 EU / ml de endotoxina control estándar (CSE) , se prepararon una serie de diluciones con agua libre de Pirógenos como diluyente, tal como se muestra en la curva estándar del esquema " 2 ", a tal concentración que se aseguró de no sobrepasar la sensibilidad especificada en el marbete de 0.125 EU/ml.

b) Se hizo un control negativo: de la solución que se usó como diluyente, en este caso agua libre de Pirógenos, se tomó una alícuota de 0.1 ml. y se dosificó a un tubo que contenía el reactivo LAL.

c) Se homogeneizaron cada una de las diluciones de la curva estándar con agitación suave durante 30 segundos.

d) A cada tubo que contenía 0.1 ml. del reactivo LAL se dosificaron por cuadruplicado cada una de las concentraciones finales.

e) Se homogeneizaron los tubos suavemente, se colocaron a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , en una placa de incubación, durante 60 minutos  $\pm$  1 minuto. Nota: si se mueven los tubos antes de que termine el tiempo de incubación; se interrumpe la reacción de gelificación en forma irreversible, pudiendo reflejar falsos negativos.

f) Al término del tiempo de incubación se observaron los tubos; una reacción positiva se caracterizó por la presencia de un gel firme persistente: se entiende por gel firme; un gel capaz de mantener su integridad con el tubo de ensayo en una posición invertida a  $180^{\circ}$ , y una reacción negativa se caracterizó por la ausencia de un gel o la forma de un gel viscoso.

La prueba de variabilidad entre analistas , se realizó con dos personas diferentes. En la precisión del analista, se realizó la prueba de sensibilidad pero en tres días diferentes un solo analista.

La sensibilidad del reactivo se tomará como correcta si está dentro de los límites de  $0.5 \lambda - 2.0 \lambda$  donde  $\lambda$  = Sensibilidad del reactivo; y la Desviación estándar no debe ser mayor de 0.396 para cuatro réplicas.

Si los resultados no cumplen con estas condiciones, habrá que investigar las posibles fallas. Las fallas pueden deberse a errores de manipulación, pureza de los reactivos o bien a la falta de dominio de la técnica.

## 2. CALCULO DE LA MAXIMA DILUCION VALIDA ( M.V.D. )

### 2.1 METOTREXATO

Para determinar cuanto producto puede ser diluido y ser capaz de detectar la concentración de endotoxina límite. Hay dos métodos diferentes.

#### Método " 1 "

Este método es usado cuando hay un límite USP Oficial o cuando el Límite aparece en el listado del apéndice "E" de la guía del método de endotoxina de Julio de 1994 de la FDA.

$$\lambda = 0.125 \text{ EU/ml.}$$

$$M = 0.5 \text{ mg / Kg}$$

$$K = 0.2 \text{ EU / Kg}$$

$$\text{Potencia del medicamento} = 5 \text{ mg / ml}$$

$$\text{Límite de Endotoxina} = 0.4 \text{ EU / ml}$$

$$\text{MVD} = \frac{\text{Límite de endotoxina} * \text{Potencia del producto mg ó vol./ml.}}{\lambda}$$

$$\text{MVD} = \frac{0.4 \text{ EU / ml} * 5 \text{ mg / ml}}{0.125 \text{ EU / ml}} = 16$$

Por lo tanto:

$$\text{MVD} = 1 : 16$$

#### Método " 2 "

Este método es usado cuando no hay límite oficial USP.

$$1^\circ \text{ M. V. C.} = \frac{\lambda * M}{K}$$

$$2^\circ \text{ M. V. D.} = \frac{\text{Potencia del producto}}{\text{MVC}}$$

$$\text{MCV} = \frac{0.125 \text{ EU/ml} * 0.5}{0.2 \text{ EU/Kg}} = 0.3125$$

$$\text{MVD} = \frac{5}{0.312} = 16$$

Por lo tanto :

$$\text{MVD} = 1 : 16$$

**Donde:**

$\lambda$  = Sensibilidad etiquetada en el lisado

**M** = Dosis por Kg de peso

**K** = Limite de tolerancia

0.2 EU/kg para medicamentos administrados por vía Intratecal y

5.0 EU/kg para todos los otros medicamentos.

## 2.2 CISPLATINO

### Método "1"

$$\lambda = 0.125 \text{ EU/ml}$$

$$M = 2.57 \text{ mg/Kg}$$

$$K = 5.0 \text{ EU/ml}$$

$$\text{Potencia del medicamento} = 10 \text{ mg/ml}$$

$$\text{Limite de endotoxina} = 2.0 \text{ EU/ml}$$

$$\text{MVD} = \frac{\text{Limite de endotoxina} * \text{Potencia del producto mg ó vol/ml}}{\lambda}$$

$$\text{MVD} = \frac{2.0 \text{ EU/ml} * 10 \text{ mg/ml}}{0.125 \text{ EU/ml}} = 1:16$$

### Método "2"

$$1^\circ \text{ M.V.C.} = \frac{\lambda * M}{K}$$

$$2^\circ \text{ M.V.D.} = \frac{\text{Potencia del producto}}{\text{MVC}}$$

$$\text{MVC} = \frac{0.125 \text{ EU/ml} * 2.57}{5 \text{ EU/Kg}} = 0.0657$$

$$\text{MVD} = \frac{1}{0.0657} = 15.555 \approx 16$$

### **3. PRUEBA DE COMPATIBILIDAD / INHIBICION DE METOTREXATO Y CISPLATINO**

#### **3.1 Preparación del liofilizado Metotrexato 1.0 mg / ml.**

- El vial de Metotrexato se diluyó con 10 ml de agua libre de pirógenos, se tomó una alícuota de 2.0 ml y se diluyó a 10 ml. con agua libre de pirógenos, donde se llegó a una concentración de 1.0 mg / ml.

#### **3.2 Preparación del producto Cisplatino 1.0 mg / ml.**

- El frasco vial de Cisplatino se diluyó con 10 ml de agua libre de pirógenos, llegando a una concentración de 1.0 mg / ml.

#### **3.3 Preparación de endotoxina 4 veces la sensibilidad del reactivo ( 4 λ )**

A partir de la concentración de 1.0 EU / ml., se tomaron 5.0 ml. y se aforaron con 10 ml con agua libre de pirógenos. ( 4 λ = 4 veces la sensibilidad del reactivo )

#### **3.4 Preparación de Endotoxina 2 veces la sensibilidad del reactivo ( 2 λ )**

A partir de la dilución de endotoxina anterior, se tomaron 5.0 ml. y se aforaron a 10 ml. con agua libre de pirógenos. ( 2 λ )

Una vez que se prepararon las soluciones anteriores se procedió a efectuar la prueba.

1°. Se prepararon diluciones seriadas, empleando un factor de dilución de 1 : 2 hasta llegar a la dilución de 1:64 para Metotrexato y también de 1:64 para Cisplatino.

- Se adicionó 1.0 ml. de agua libre de pirógenos a cada tubo vacío previamente esterilizado ( 6 tubos en total ).
- Después sólo al primer tubo, se añadió 1.0 ml. de Metotrexato de concentración de 1.0 mg / ml, y luego se diluyó en serie, se tomaron 1.0 ml de cada tubo al siguiente y así sucesivamente, hasta llegar a una dilución de 1:32. Esto se muestra el Esquema "3" de compatibilidad.

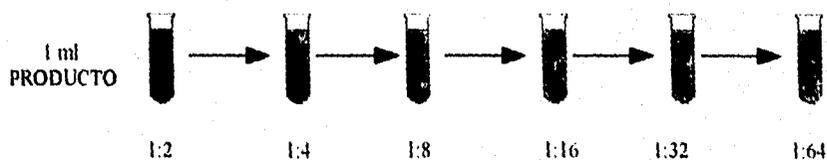
- 2º De cada tubo anterior se tomó 1.0 ml. y se colocó en a otro tubo estéril, añadiendo 1.0 ml de endotoxina de concentración 4 λ, por lo que las diluciones comienzan de 1:4 hasta 1:128.
- 3º Se tomó 1.0 ml de Metotrexato 1.0 mg/ml y se adicionó 1.0 ml. de endotoxina 4 λ, esta es la dilución 1:2 que estaba faltante en la serie de diluciones.
- 4º Con el producto Metotrexato como diluyente se preparó una dilución a una concentración de endotoxina 2.0 λ. (esquema 3), como se indica en el primer paso, pero en lugar de utilizar agua se diluyó con endotoxina.
- 5º Una vez que se tuvieron todas las diluciones se homogenizaron todos los tubos suavemente, se incubaron en la placa de incubación de calor seco a  $37.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 60.0 minutos  $\pm 1.0$  minuto, sin moverlos hasta que terminó el tiempo de incubación se observaron los tubos.  
El mismo procedimiento que se realizó para metotrexato se siguió para cisplatino ya que ambos tienen la misma MVD. ( 1 : 16 )

La concentración no inhibitoria experimental será la concentración del producto a la cual la prueba LAL no es inhibida.

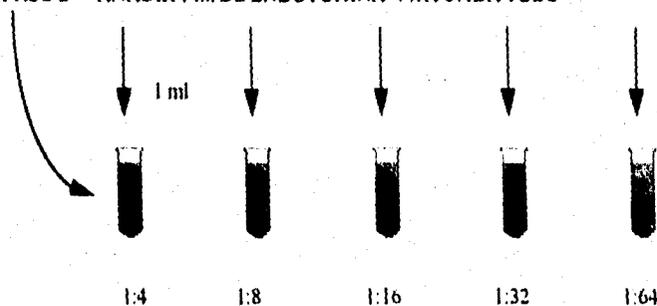
### ESQUEMA 3

#### SERIE DE DILUCIONES PARA COMPATIBILIDAD DEL PRODUCTO

PASO 1 AÑADIR 1 ml DE AGUA LIBRE DE PIROGENOS A CADA TUBO; AÑADIR 1 ml DEL PRODUCTO AL PRIMER TUBO Y DILUIR EN SERIE.



PASO 2 AÑADIR 1 ml DE ENDOTOXINA 4  $\lambda$  A CADA TUBO



PASO 3 TOMAR 1 ml DEL PRODUCTO SIN DILUIR + 1 ml ENDOTOXINA 4  $\lambda$  = DILUCION 1:2

PASO 4 PREPARAR UNA DILUCION DE ENDOTOXINA QUE CONTIENE 2  $\lambda$  COMO LO INDICA EN EL PASO 4  $\lambda$ .

## **E. DETERMINACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN METOTREXATO Y CISPLATINO**

### **1. METOTREXATO 50 mg. Liofilizado**

Se reconstituyó el vial con 10 ml. de agua libre de pirógenos. LAL. (5.0 mg/ml.)

### **2. CISPLATINO 10 mg. Liofilizado.**

- El vial se reconstituyó con 10 ml de agua LAL libre de pirógenos. (1.0 mg/ml).

- Se preparó a partir de las soluciones anteriores, para cada producto se surgió el mismo procedimiento. Se prepararon diluciones seriadas comenzando con 1.0 ml empleando un factor de dilución de 1:2 hasta la máxima dilución válida para Metotrexato 1:16 y para Cisplatino 1:16. Se diluyeron con agua libre de pirógenos.

- Se adicionaron por duplicado 0.1 ml de cada una de las diluciones, a cada uno de los tubos conteniendo 0.1 ml. de LAL.

- Se prepararon por duplicado 2 tubos para control negativo y dos tubos para control positivo a dos veces  $\lambda$ .

**CONTROL NEGATIVO:** Se colocaron 0.1 ml. de agua libre de pirógenos que se utilizó como diluyente, al tubo que contenía 0.1 ml. del reactivo LAL.

**CONTROL POSITIVO:** Se colocaron 0.1 ml de la concentración de endotoxina 2  $\lambda$ . (la cual presentó reacción positiva), a los tubos que contenían 0.1 de reactivo LAL.

- Se homogeneizaron las muestras y se adicionaron al tubo que contenía el reactivo LAL, se incubaron inmediatamente a  $37.0^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ . Tomando el tiempo de 60.0 minutos  $\pm 1$ , para cada muestra. Se observaron resultados Al término del tiempo de incubación se observaron los tubos; una reacción positiva se caracterizó por la presencia de un gel firme persistente: se entiende por gel firme; un gel capaz de mantener su integridad con el tubo de ensayo en una posición invertida a  $180^{\circ}$ , y una reacción negativa se caracterizó por la ausencia de un gel o la forma de un gel viscoso.

## **F. REPRODUCIBILIDAD DEL METODO DE CUANTIFICACION DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS**

La reproducibilidad pudo demostrarse. Esto se acompañó por pruebas triplicadas, usando lotes diferentes del producto.

El método de cuantificación de endotoxinas bacterianas también se verificó con dos analistas diferentes para corroborar que el método es reproducible.

Ya obtenida la máxima dilución válida (MVD) y demostrado que los productos fueron compatibles con LAL, y en este caso se usaron dos lotes diferentes del producto Metotrexato y un lote para Cisplatino.

Se hizo una serie de diluciones del producto tal como marcaba su potencia para Cisplatino de 1.0 mg/ml y para Metotrexato 5.0 mg/ml. después se fue diluyendo en forma de cascada ( 1 :2 ) con agua libre de pirógenos hasta su MVD. A cada una de las diluciones se adicionó 0.1 ml, a cada uno de los tubos conteniendo 0.1 ml de LAL. ( como el inciso "E" de la determinación de endotoxinas).

Homogeneizadas las muestras, se incubaron a 37 ° C, durante 60 minutos y se observaron resultados.

Al término del tiempo de incubación se observaron los tubos; una reacción positiva se caracterizó por la presencia de un gel firme persistente: se entiende por gel firme; un gel capaz de mantener su integridad con el tubo de ensayo en una posición invertida a 180 ° , y una reacción negativa se caracterizó por la ausencia de un gel o la forma de un gel viscoso

## VII. RESULTADOS Y ANALISIS

### A. RESULTADOS DE LA CALIFICACION DEL AREA DE TRABAJO

El área cuenta con los siguientes servicios

*- Instalacion eléctrica*

Capacidad	<u>120 v</u>
Conexiones	<u>Cumplen</u>
Identificaciones	<u>Cumplen</u>

*- Ventilacion*

Sistema de Extraccion	<u>Cumplen</u>
-----------------------	----------------

*- Campana de Flujo Laminar*

Tipo	<u>Horizontal</u>
Fabricante	<u>Veeco</u>

#### *Materiales en Contacto con el Producto*

*- Pantalla de Acrilico*

Tipo	<u>Vertical</u>
Dimensiones	<u>50 cm X 70 cm</u>

*- Papel Absorbente*

Tipo	<u>Whatman N° 50</u>
------	----------------------

## B. RESULTADOS DE POTENCIA DE ENDOTOXINA

### ESTANDARIZACION DE ENDOTOXINA CSE VS ENDOTOXINA RSE

	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA PSE EU/ml						PUNTO FINAL
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	0.016	RESULTADO
	*	*	*	*	*	*	+
1	*	*	*	*	*	*	0.031
2	*	*	*	*	*	*	0.125
3	*	*	*	*	*	*	0.031
4	*	*	*	*	*	*	0.125

MEDIA GEOMETRICA  
GM = 0.078 EU/ml

TABLA I RESULTADOS DE CONCENTRACION DE ENDOTOXINA ESTANDAR DE REFERENCIA (RSE)

La sensibilidad del reactivo determinada con la endotoxina USP es más sensible ya que va desde 0.031 EU/ml es decir puede detectar menores cantidades, obteniéndose una media de 0.078 EU/ml (fórmula 1). Tomándose la dilución más baja donde dio positiva la respuesta.

	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA CSE ng/ml						PUNTO FINAL
	0.0500	0.0250	0.0125	0.0062	0.0031	0.0016	RESULTADO
	*	*	*	*	*	*	+
1	*	*	*	*	*	*	0.0125
2	*	*	*	*	*	*	0.0062
3	*	*	*	*	*	*	0.0031
4	*	*	*	*	*	*	0.0125

MEDIA GEOMETRICA  
GM = 0.0093 ng/ml

TABLA II RESULTADOS DE CONCENTRACION DE ENDOTOXINA CONTROL ESTANDAR (CSE)

Aquí se muestran resultados con la endotoxina control expresada en nanogramos por mililitro (ng/ml), observándose resultado positivo en la dilución de 0.0062 ng/ml. Se calculó la potencia según fórmula 3. Por lo que los resultados reportados para la potencia muestran que 0.0093 ng/ml (CSE) es igual a 0.078 EU/ml de la RSE, por lo que se deduce que la potencia es de 8.387 EU/ng que es equivalente a 4.193 EU/vial.

$$8.387 \text{ EU/ng} \times 500 \text{ ng/vial CSE} = 4.193 \text{ EU/vial}$$

ENDOTOXINA	MEDIA GEOMETRICA	POTENCIA TEORICA PROVEEDOR EU/ng	POTENCIA TEORICA GUIA DE VALIDACION EU/ng	POTENCIA HALLADA
RSE:	0.078 EU/ml	2.0 - 10 EU/ng	2.0 - 50 EU/ng	8.387 EU/ng
CSE:	0.0093 EU/ml	2.0 - 10 EU/ng	2.0 - 50 EU/ng	

**TABLA III. RESULTADOS DE LA COMPARACION DE POTENCIA DE ENDOTOXINA.**

La potencia obtenida cumple ya que se encuentra dentro del rango establecido por el proveedor y por la guía de validación siendo esta de 8.367 EU/ng. Por lo tanto La endotoxina estándar de control obtiene una potencia permitida dentro del, para evaluar la sensibilidad del reactivo Lisado de Amebocitos de Limulus a 0.125 EU/ml.

## C. RESULTADOS DE SENSIBILIDAD DEL REACTIVO

ANALISTA 1

	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA EU/ml					PUNTO FINAL	
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	RESULTADO	Log <sub>10</sub>
						+/-	
1	+	+	+	+	-	0.062	-1.2041
2	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
3	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
4	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031

ANALISTA 2

	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA EU/ml					PUNTO FINAL	
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	RESULTADO	Log <sub>10</sub>
						+/-	
1	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
2	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
3	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
4	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031

TABLA IV. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD DEL REACTIVO EN METOTREXATO.

La sensibilidad del reactivo en ambos analistas cae satisfactoriamente en 0.125 EU/ml respecto a lo etiquetado, ( 0.500 EU/ml a 0.310 EU/ml ) se observa que el analista 1 se diferencia en un resultado de la 1ª replica de una dilución. Se calculó la sensibilidad con la fórmula (1) de la media geométrica de sus logaritmos en base 10, para cada uno de los ensayos realizados. En la siguiente tabla (V) se encuentran los resultados resumidos de la variabilidad entre analistas, observándose que los resultados de la desviación estándar (fórmula 2) están dentro de especificación ya que el límite es de 0.365, y por lo tanto la variabilidad entre analistas es despreciable. Ya que esta prueba es primordial para que el método sea confiable y preciso. Por lo tanto se cumple.

	LIMITE TEORICO	$\lambda$ TEORICA EU/ml	$\lambda$ OBTENIDA EU/ml	SD TEORICA	SD OBTENIDA
ANALISTA 1	0.5 $\lambda$ a 2.0 $\lambda$ 0.5 EU/ml a 2.0 EU/ml	0.125 EU/ml	0.1093 EU/ml	0.365	0.1411
ANALISTA 2	0.5 $\lambda$ a 2.0 $\lambda$ 0.5 EU/ml a 2.0 EU/ml	0.125 EU/ml	0.1250 EU/ml	0.365	0.0000

TABLA V. VARIABILIDAD ENTRE ANALISTAS.

DIA	ENDOTOXINA EU/ml					LOG <sub>10</sub>	S.D.
	0.500	0.250	0.125	0.0625	0.0312		
DIA 1	-	+	-	-	-	-0.9031	0.0000
	-	-	+	-	-	-0.9031	
	-	+	-	-	-	-0.9031	
	-	-	-	-	-	-0.9031	
DIA 2	-	-	-	-	-	-0.9031	0.1411
	-	+	-	-	-	-0.9031	
	-	+	-	-	-	-1.2041	
	-	+	-	-	-	-0.9031	
DIA 3	-	+	+	-	-	-0.9031	0.0000
	-	+	-	-	-	-0.9031	
	-	-	+	-	-	-0.9031	
	-	-	+	-	-	-0.9031	

TABLA VI. RESULTADOS DE LA PRECISION DEL ANALISTA. La precisión del analista es buena ya que el día 1 y el día 3 se repiten los resultados, aunque los resultados del segundo día se diferencian en solo una réplica de una dilución más baja, pero está cercana a 0.125 EU/ml que es la sensibilidad especificada por el proveedor, ademas la desviación estándar está dentro de los límites establecidos.

SENSIBILIDAD DEL REACTIVO EN CISPLATINO

ANALISTA 1

	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA EU/ml					PUNTO FINAL	
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	RESULTADO	Log <sub>10</sub>
						+/-	
1	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
2	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
3	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
4	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031

ANALISTA 2

	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA EU/ml					PUNTO FINAL	
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031	RESULTADO	Log <sub>10</sub>
						+/-	
1	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
2	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
3	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031
4	+	+	+	-	-	0.125	-0.9031

TABLA VII. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD DEL REACTIVO EN CISPLATINO

La sensibilidad del reactivo para ambos analistas es de 0.125 EU/ml tal como se muestra la sensibilidad etiquetada. Se calculó la sensibilidad con la fórmula (1) de la media geométrica de sus logaritmos en base 10, para cada uno de los ensayos realizados. En la siguiente tabla (VIII) se encuentran los resultados resumidos de la variabilidad entre analistas, observándose que los resultados de la desviación estándar calculados con la fórmula 2 están dentro de especificación ya que el límite es de 0.365, y por lo tanto, la variabilidad entre analistas es nula, porque ambos obtienen una desviación de 0.000. Por lo tanto, el método tanto para Metotrexato como para Cisplatino se considera confiable y preciso.

	LIMITE TEORICO	$\lambda$ TEORICA EU/ml	$\lambda$ OBTENIDA EU/ml	SD TEORICA	SD OBTENIDA
ANALISTA 1	0.5 $\lambda$ a 2.0 $\lambda$ 0.5 Eu/ml a 2.0 Eu/ml	0.1250 EU/ml	0.1250 EU/ml	0.365	0.0000
ANALISTA 2	0.5 $\lambda$ a 2.0 $\lambda$ 0.5 Eu/ml a 2.0 Eu/ml	0.1250 EU/ml	0.1250 EU/ml	0.365	0.0000

TABLA VIII. VARIABILIDAD ENTRE ANALISTAS.

DIA	ENDOTOXINA EU/ ml					LOG <sub>10</sub>	S.D.
	0.500	0.250	0.125	0.0625	0.0312		
DIA 1	+	+	+	-	-	-0.9031	0.1411
	+	+	+	-	-	-0.9031	
	+	-	+	+	-	-0.9031	
	-	+	+	-	-	-0.9031	
DIA 2	+	+	-	-	-	-0.9031	0.0000
	+	+	+	-	-	-0.9031	
	+	+	+	+	-	-1.2041	
	+	+	+	-	-	-0.9031	
DIA 3	+	+	+	-	-	-0.9031	0.0000
	-	+	+	-	-	-0.9031	
	+	+	+	-	-	-0.9031	
	+	+	+	-	-	-0.9031	

TABLA IX. RESULTADOS DE LA PRECISION DEL ANALISTA.

La precisión del analista es buena ya que se demostró cierta habilidad en el manejo del reactivo ya que sólo tuvo una variación de una replica de 1 primer día y los dos siguientes días obtuvo la misma sensibilidad de 0.125 Eu/ml que es la especificada por el proveedor, además la desviación estándar obtenida está dentro de los límites establecidos siendo ésta no mayor de 0.365.

### D. RESULTADOS DE COMPATIBILIDAD / INHIBICION

METOTREXATO

REPLICA	CONCENTRACION DEL PRODUCTO mg / ml SIN ENDOTOXINA				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
	0.500 mg	0.250 mg	0.125 mg	0.0620 mg	0.0310 mg
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-

TABLA X. DILUCION DE PRODUCTO EN AGUA SIN ENDOTOXINA  
El producto diluido en agua a diferentes concentraciones al reaccionar con LAL da resultados negativos lo que indica que es compatible y que no hay la presencia de endotoxina en el producto.

REPLICA	CONCENTRACION DEL PRODUCTO mg / ml CON ENDOTOXINA 4 λ				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
	0.500 mg	0.250 mg	0.125 mg	0.0620 mg	0.0310 mg
1	+	+	+	-	-
2	+	+	+	+	-

TABLA XI. Al diluir el producto con endotoxina a 4 λ, no se presentó inhibición ya que la respuesta positiva dió en 1:16, que es donde se encuentra el punto final siendo su límite de endotoxina para Metotrexato.

REPLICA	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA 2 λ DILUIDA CON PRODUCTO 1 mg / ml				
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031
1	+	+	+	-	-
2	+	+	+	-	-

TABLA XII. El producto diluido con la endotoxina a 2 λ, igual que la tabla anterior indica que tampoco existe inhibición ya que hay respuesta hasta una concentración de 0.062 mg/ml, por lo tanto se demostró que el producto es compatible y no inhiben la formación del gel, hasta su máxima dilución válida que es 1:16.

## D. COMPATIBILIDAD / INHIBICION

REPLICA	CONCENTRACION DEL PRODUCTO mg / ml SIN ENDOTOXINA					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0.500 mg	0.250 mg	0.125 mg	0.0620 mg	0.0310 mg	0.0155mg
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-

TABLA XIII. DILUCION DE PRODUCTO EN AGUA SIN ENDOTOXINA

El producto Cisplatino diluido en agua , a diferentes concentraciones frente a LAL, nos indica que no hay presencia de endotoxina y que es compatible el producto con el reactivo LAL.

REPLICA	CONCENTRACION DEL PRODUCTO mg / ml CON ENDOTOXINA 4 λ					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
	0.500 mg	0.250 mg	0.125 mg	0.0620 mg	0.0310 mg	0.0155mg
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-

TABLA XIV. DILUCION DE ENDOTOXINA CON PRODUCTO

El producto diluido con endotoxina 4 λ muestra respuestas positivas, por lo que no presenta inhibición a la dilución de 1 : 32 , a más diluciones inhibe ya que se encuentra su límite de endotoxina complementando con la tabla anterior se demuestra que el producto no inhibe la reacción con endotoxina.

CISPLATINO

	CONCENTRACION DE ENDOTOXINA 2 λ DILUIDA CON PRODUCTO 1 mg / ml				
	0.500	0.250	0.125	0.062	0.031
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	-	-
3	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	-

TABLA XV. DILUCION DE PRODUCTO CISPLATINO CON ENDOTOXINA

La dilución del producto con endotoxina a 2 veces la sensibilidad del reactivo , muestra que hay respuesta en la dilución de concentración 0.062, lo cual indica que de igual manera el producto con endotoxina a 2 λ, no muestra inhibición hasta 0.062.

**E. RESULTADOS DE REPRODUCIBILIDAD  
METOTREXATO**

METOTREXATO

LOTE " 1 "

ENDOTOXINA CON AGUA		REPLICA			
DILUCION	CONCENTRACION EU/ml	1	2	3	4
1.0	1.0	+	+	+	+
1:2	0.5	+	+	+	+
1:4	0.25	+	+	+	+
1:8	0.125	+	+	+	-
1:16	0.062	-	-	-	-
1:32	0.031	-	-	-	-

**TABLA XVI. ENDOTOXINA DILUIDA CON AGUA**

Las diluciones de endotoxina con agua se encuentran dando respuesta en la cuarta dilución que es la sensibilidad del reactivo, lo que es indicativo que puede detectarse endotoxina hasta una concentración de 0.125 EU/ml hacia arriba.

LOTE " 2 "

ENDOTOXINA CON AGUA		REPLICA			
DILUCION	CONCENTRACION EU/ml	1	2	3	4
1.0	1.0	+	+	+	+
1:2	0.5	+	+	+	+
1:4	0.25	+	+	+	+
1:8	0.125	-	+	+	+
1:16	0.062	-	-	-	-
1:32	0.031	-	-	-	-

**TABLA XVII. ENDOTOXINA DILUIDA CON AGUA**

Las diluciones de endotoxina con agua del lote "2", son semejantes a los resultados del lote "1", lo cual indica que no hay variación entre los dos lotes.

## REPRODUCIBILIDAD

METOTRENATO

ENDOTOXINA CON PRODUCTO		REPLICA			
DILUCION	CONCENTRACION EU/ml	1	2	3	4
1.0	1.0	+	+	+	+
1:2	0.5	+	+	+	+
1:4	0.25	+	+	+	+
1:8	0.125	-	+	+	-
1:16	0.062	-	-	-	-
1:32	0.036	-	-	-	-

LOTE " 1 "

**TABLA XVIII. ENDOTOXINA DILUIDA CON PRODUCTO LOTE 1**

La endotoxina diluida con producto a una concentración de 1.0 mg/ml, da respuesta en la dilución 1:8 variando en dos réplicas, indicando que se puede detectar endotoxina a cualquier concentración de las diluciones anteriores usando LAL a 0.125 EU/ml.

LOTE " 2 "

ENDOTOXINA CON PRODUCTO		REPLICA			
DILUCION	CONCENTRACION EU/ml	1	2	3	4
1.0	1.0	+	+	+	+
1:2	0.5	+	+	+	+
1:4	0.25	+	+	+	+
1:8	0.125	+	+	+	-
1:16	0.062	-	-	-	-
1:32	0.036	-	-	-	-

**TABLA XIX. ENDOTOXINA DILUIDA CON PRODUCTO LOTE 2**

La endotoxina diluida con producto, da respuesta en la dilución 1:8 variando en una réplica, en comparación con el lote " 1 ", lo cual indica que es reproducible el método.

## REPRODUCIBILIDAD

REPLICA	CONCENTRACION DEL PRODUCTO mg / ml SIN ENDOTOXINA				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
	0.500 mg	0.250 mg	0.125 mg	0.0620 mg	0.0310 mg
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-

LOTE " 1 "

TABLA XX. DILUCION DE PRODUCTO EN AGUA SIN ENDOTOXINA

La prueba de rutina es cuando el producto es diluido en agua y se hace reaccionar con el reactivo LAL , tal como se observa en esta tabla donde los resultados son, negativos lo cual indica que el producto Metotrexato está libre de Endotoxina.

REPLICA	CONCENTRACION DEL PRODUCTO mg / ml				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
	0.500 mg	0.250 mg	0.125 mg	0.0620 mg	0.0310 mg
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-

LOTE " 2 "

TABLA XXI. DILUCION DE PRODUCTO EN AGUA SIN ENDOTOXINA

Lo mismo que el lote " 1 " y como se observa en la tabla anterior, el producto del lote " 2 " no tiene endotoxina, se reafirma que el metodo es reproducible para este producto.

## E. REPRODUCIBILIDAD EN CISPLATINO

CISPLATINO

ENDOTOXINA CON AGUA		REPLICA			
DILUCION	CONCENTRACION EU/ml	1	2	3	4
1:0	1.0	+	+	+	+
1:2	0.5	+	+	+	+
1:4	0.25	+	+	+	+
1:8	0.125	+	+	+	+
1:16	0.062	-	-	-	-
1:32	0.036	-	-	-	-

TABLA XXII. ENDOTOXINA DILUIDA CON AGUA

La endotoxina diluida en agua puede detectarse a hasta la cuarta dilución es decir hasta 0.125 EU/ml, tal como lo marca la sensibilidad del reactivo, lo cual indica que hay reproducibilidad.

ENDOTOXINA CON PRODUCTO		REPLICA			
DILUCION	CONCENTRACION EU/ml	1	2	3	4
1:0	1.0	+	+	+	+
1:2	0.5	+	+	+	+
1:4	0.25	+	+	+	+
1:8	0.125	+	+	+	+
1:16	0.062	-	-	-	-
1:32	0.036	-	-	-	-

TABLA XXIII. ENDOTOXINA DILUIDA CON PRODUCTO

La endotoxina diluida en producto puede detectarse hasta la cuarta dilución es decir hasta 0.125 EU/ml, tal como se observa en la tabla anterior que son compatibles y que hay reproducibilidad.

## REPRODUCIBILIDAD

REPLICA	CONCENTRACION DEL PRODUCTO mg /ml SIN ENDOTOXINA				
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
	0.500 mg	0.250 mg	0.125 mg	0.0620 mg	0.0310 mg
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-

TABLA XXIV. DILUCION DE PRODUCTO CISPLATINO EN AGUA

La determinación de endotoxinas bacterianas se lleva a cabo diluyendo el producto con agua y haciendolo reaccionar con el reactivo LAL, tal como se observa en esta tabla, lo cual demuestra que el producto se encuentra libre de endotoxina, y si se observa en la tabla XIII los resultados son semejantes por lo que se deduce que el metodo es reproducible y confiable.

## VIII. CONCLUSIONES

1. Con los resultados obtenidos en cuanto a la variabilidad de los analistas se observa que hay un adecuado manejo del reactivo LAL, cumpliéndose así uno de los objetivos, el de manejar con precisión el reactivo, revelando resultados confiables para las pruebas subsecuentes.
2. Al establecerse la máxima concentración válida ( M. V. D. ) y la mínima concentración válida ( M. C. V. ) de cada uno de los productos, Metotrexato y Cisplatino, se pudo calcular y experimentar a qué concentración, cada uno de los productos fueron compatibles o inhibidos con el reactivo LAL, por lo que con los resultados obtenidos se observó que no hubo inhibición y que hay compatibilidad del reactivo con dichos productos, ya que se demostró la formación de un gel con la presencia de endotoxinas. Además, los puntos de las dos series fueron iguales y no se diferenciaron por más de una dilución.
3. Se considera que el método empleado para la determinación de endotoxinas bacterianas, es una prueba extremadamente sensible y específica para la detección de endotoxinas bacterianas por lo que es un método reproducible, confiable y sensible ya que detecta cantidades mínimas de endotoxinas como se pudo observar para ambos productos, asegurando con esta técnica la calidad del producto.
4. El método quedó validado ya que cumplió con los requisitos de reproducibilidad, compatibilidad y confiabilidad, por lo que puede ser sustituto de la prueba oficial en conejos.

## IX. SUGERENCIAS

- Todas las operaciones relacionadas con el manejo de los productos oncológicos deberán apegarse a las Buenas Prácticas de Manufactura ya que dichos productos Oncológicos son considerados de alto riesgo al estar su principio activo en contacto con la piel, al ser aspirado o ingerido.
- Todo el material desechable usado en dichos productos deberá incinerarse, y el que no es desechable inactivarlo con las soluciones inactivadores mencionadas en las páginas de destrucción de cada producto.
- No usar agua bacteriostática para la realización de la prueba.
- Material de Vidrio.- Debe ser esterilizado por calor seco 200 ° C por 2 Hrs. o 250 ° C por lo menos 30 minutos.
- Temperatura.- La temperatura de incubación debe mantenerse de 36 a 38 ° C. Se ha observado que la reacción se retarda fuera de este rango.
- pH.- El pH del producto debe ser ajustado de 6 a 8, con las soluciones de HCl o NaOH 0.1 N.
- Incubación.- El tubo debe permanecer sin agitación durante la incubación, se ha observado que una agitación previa puede destruir el gel irreversiblemente llevando a un resultado falso negativo.
- Tomar en cuenta la viscosidad del producto, esta interferencia puede eliminarse por dilución.
- El Reactivo LAL debe almacenarse a 5 ° C.
- El reactivo LAL toma un color café pardusco cuando existe degradación; este debe ser de color blanco, si no se desechará..
- Es recomendable que por lo menos se use un control positivo y un control negativo cada vez que se realice la prueba para corroborar el perfecto estado del reactivo.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## X. BIBLIOGRAFIA

1. Akers M.J. Limulus Amebocyte Lisate. Parenteral Quality Control. Boletín Técnico Reagent Endofase. 1988
2. Boletín Técnico. Grupo MALLINCKRODT. (P.O. Box 5840) St. Louis Missouri U.S.A. 1986.
3. Depyrogenation. Technical Report Nº 7. Parenteral Drugs Association Philadelphia, 1988 pp. 1-2 y 98-100.
4. Davis J. Tratado de Microbiología. De. Salvat Editores S. A. 2ª Ed. México, 1982; pp. 635-639.
5. Dawson M. E. Microbes, Endotoxins and Water, Pharmaceutical Engineering, 8:2 March - April 1988 pp. 22 - 27.
6. Pearson, F. C. Weary M. " A Manufacturer's Guide to Depyrogenation " Bio Pharm; April. 1988 pp. 22 -27.
7. Boletín Técnico. Grupo MALLINCKRODT. Instructivo Pyrogen (P.O. Box 5840) St Louis Missouri U.S.A. 1982.
8. Pearson, F. C. " Pyrogens and Depyrogenation ": Theory and Practice Travenal Laboratories, U.S.A.; 1985 pp. 75 - 100.
9. European Workshop on Detection and Quantification of Pyrogen; Pharmaeuropa The European Pharmacopeia Forum; Numero Especial vol I Noviembre, 1989 pp. 1 - 17.
10. Boletín Técnico. Grupo MALLINCKRODT. Instructivo Pyrogen (P.O. Box 5840) St Louis Missouri U.S.A. 1983.

11. Cooper, J. F. " Principles and Applications of the Limulus Test for Pyrogen " Parenteral Drugs. Bull Parent. Drug Assoc.; 29 : 3 , 1975 pp. 122 - 130.
12. D. Terrible Patricia., Validation of Bacterial Endotoxin Test for Drug Products. Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas. 20 : 6. Febrero - Marzo 1990 pp. 32 - 37.
13. Cooper, J. F. Formulae for Maximun Valid Dilution Endotoxins and Their Detection with the Limulus Amebocyte Lisate Test. Inc. 1982. pp 55
14. Boletín Técnico. Grupo MALLINCKRODT. Instrutivo Pyrogen (P.O. Box 5840 ) St Louis Missouri U.S.A. 1981.
15. Guerra J.; Validation of Analytical Methods by F.D.A. Laboratories. Pharmaceutical Technology; March 1986 pp. 76 - 78.
16. Giral B.C. et al Guía de Validación de Métodos Analíticos. Comité de Validación de Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmaceuticos Biologos, México 1988.
17. " A Guideline on Validation of the LAL, end Product Endotoxin Test for Human and Animal Parenteral Drugs, Biological Products, and Medical Devices " Food and Drug Administration ( FDA) U.S.A. July 1994.
18. United States Pharmacopeia U.S.P. XXIII. 1995. pp. 984 - 985, 1696- 1698.
19. The Merck Index, 10 th ed., Merck and Co., Rahway, N.Y. 1983, pp. 782 , 1157
20. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 6ª ed., Secretaría de Salud, México D.F. 1995. pp. 135 - 137, 205 - 207, 212-214, 1058-1060.
21. Procedimientos de Operacion e Inactivación y Análisis de productos Oncológicos. FRH-001, FEC-033. Laboratorios Fustery S.A. de C.V. 1993.
22. Martindale The Extra Pharmacopeia. Thirtieth edition. The Pharmaceutical Press. 1993. pp. 434 -437, 463 - 466, 488 - 506.

23. Loebl S. Sprta G., Manual de farmacología. Grupo Noriega, Editorial Limusa vol. I, capítulo II; 1991. pp. 189 - 219.
24. Destruction of Hazardous Chemical in the Laboratory. A Wiley Interscience Publication. 1990. Boletín Técnico.
25. Klaus Florey. Analytical Profiles of Drugs Substances. Academic Press, New York, U.S.A., vol. 5 1987. pp. 291
26. Norma IMSS - JCC 01 / 324.1760 Amopterina 50 mg. Liofilizado. México.
27. Norma IMSS - JCC 01 / 372. 1706 Citotrexato 10 mg. Liofilizado. México.
28. Vicent T. Devita Jr. et al. "CANCER Principios y Práctica de Oncología" Tomo 1, Salvat Editores. Barcelona España. 1984. pp. 35 - 40, 68-85, 102 - 123 , 245- 265.

## XI. ANEXOS

### FORMULA 1

#### MEDIA GEOMETRICA

$$G. M. = 10^Y$$

$$\text{DONDE } Y = \frac{\sum_{y=1}^n n}{n}$$

Y = Log 10 ( X= 1,2, 3.....n )

n = N° de ensayos para la replica del punto final.

X = Punto final de gelificacion en EU / ml.

### FORMULA 2

#### DESVIACION ESTANDAR

$$S. D. = \frac{n \left( \sum_{y=1}^n Y^2 \right) - \left( \sum_{y=1}^n Y \right)^2}{n ( n - 1 )}$$

De Donde:

Y<sub>y</sub> = Log X<sub>y</sub> ( y = 1,2..... n )

X<sub>i</sub> = Punto final de gelificacion en Eu / ml.

n = Numero de ensayos duplicados de punto final

### **FORMULA 3**

#### **POTENCIA DE ENDOTOXINA**

$$\text{POTENCIA DE ENDOTOXINA} = \frac{\text{G.M. RSE}}{\text{G.M. CSE}} = \text{Eu / ml}$$

Donde G.M. RSE = Media Geometrica de la Endotoxina de Ref. USP  
en Eu / ml.

y G.M. CSE = Media Geometrica de la Endotoxina Estandar  
en ng / ml.

### **FORMULA 4**

#### **LIMITE DE TOLERANCIA**

$$\text{LIMITE DE TOLERANCIA} = \frac{\text{K}}{\text{M}}$$

Donde: K= Umbrales de Limite de Tolerancia.

0.2 EU / Kg para medicamentos administrados por vía Intratecal.

5.0 EU / Kg Todos los otros medicamentos.

M= Dosis / Kg Máxima para humano o conejo.