

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria  
Instituto de Farmacia y Alimentos

**Obtención y caracterización de Materiales de  
Referencia Internos para el control de calidad del  
SURFACEN**

Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias en la especialidad  
de: Ciencias Farmacéuticas

Autora: Lic. María del Carmen Travieso Novelles, Ms.C.  
Tutora: Lic. Alejandra Villoch Cambas, Dr.C.  
Asesor: Lic. Nestor Pérez Souto, Dr.C.

La Habana  
.....2004

**Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria  
Instituto de Farmacia y Alimentos**

***Obtención y caracterización de Materiales de  
Referencia Internos para el control de calidad del  
SUR FACEN***

Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias en la especialidad  
de: Ciencias Farmacéuticas

Autora: Lic. María del Carmen Travieso Novelles, Ms.C.

Tutora: Lic. Alejandra Villoch Cambas, Dr.C.

Asesor: Lic. Nestor Pérez Souto, Dr.C.

**La Habana  
.....2004**





*A Adrian,  
por ser la luz que ilumina cada uno de mis días*

*A mis padres, por haberme regalado la vida*



# AGRADECIMIENTOS

## **AGRADECIMIENTOS**

*Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que nos han colaborado para la culminación de esta tarea, y ayudado en mi formación como profesional de la ciencia.*

*A mi tutora, Dra. Alejandra Villoch Cambas por sus orientaciones precisas, su confianza y ayuda incondicional en la realización de este trabajo.*

*A los investigadores Dr. Roberto Faure García; el Dr. Néstor Pérez Souto, la Dra. Elaine Díaz Casañas, y al Dr. Arturo Escobar por sus valiosas sugerencias y críticas oportunas que nos permitieron profundizar en todos los aspectos abordados.*

*A todos los integrantes de la Dirección de Calidad, quienes fueron incondicionales para apoyar esta tarea, en especial a Valerio Fraga, Arsenio Betancourt, Aleyda Pérez, Deysi González, y Daylén Turtos, quienes son coautores de estos resultados.*

*A todo el personal de la Planta de Inyectables, en especial a: Wilma Alfonso, Danay González, y Hugo Aguilar.*

*A la Dra. Iliana Miranda por su apoyo en la estadística, a la Lic. Berta Viera por su asesoramiento en los análisis económicos, y a Roberto Zardiñas Lorenzo, por los excelentes servicios de fotografía y encuadernado del documento.*

*A todos nuestros profesores que nos formaron e inculcaron el amor por la especialidad Farmacéutica.*

*Por último, agradecer eternamente a mi familia, en especial a mi pequeño Adrian por prescindir de mí muchos días, y por ser un niño que me enorgullece a cada momento.*



# ***SINTESIS***

## **SÍNTESIS**

Este trabajo se realizó con vistas a garantizar confianza en los resultados del control de calidad del SURFACEN, cumplimentando la tenencia de Materiales de referencia para el control interno de los métodos analíticos, así como la demostración de la aptitud de estos para los fines previstos.

Se obtuvieron dos tecnologías alternativas a la de obtención del medicamento, para la elaboración de Materiales de Referencia de fosfolípidos a partir de pulmón de conejos, para ser utilizados en el control interno de los ensayos bioquímicos y biológicos de evaluación del surfactante natural pulmonar *SURFACEN*.

La primera tecnología fue validada mediante la producción de tres lotes de Material de Referencia Interno de fosfolípidos (MRI), los cuales fueron caracterizados bioquímica y tecnológicamente, demostrándose que cumplían con todos los requisitos de calidad que le exigen a este tipo de producto para fines analíticos. Se establecieron los indicadores de calidad de este MRI. La segunda tecnología permitió la obtención de un candidato a Material de Referencia Interno Biológico (MRIB), con la actividad biológica requerida para permitir su uso como control positivo en el método de gazapos inmaduros. Se elaboraron y caracterizaron dos lotes de este MRIB con resultados preliminares promisorios.

Fueron previamente validados los métodos analíticos que se utilizaron para la caracterización bioquímica, comprobándose en todos los casos que los mismos cumplen con los indicadores que establece la USP XXIV para cada tipo de método. Además se estandarizó, optimizó y validó un nuevo sistema de análisis de fosfolípidos por CLAR que permite la separación y cuantificación rápida de los principales componentes del producto, específicamente el principio activo y el producto de degradación.

Por último se realizó un estudio de factibilidad económica de las tecnologías propuestas y del nuevo sistema analítico que avala la posibilidad de la introducción de estos resultados en el sistema de control de calidad de este importante producto con vistas a la disminución de los costos de calidad, garantizar el cumplimiento de las regulaciones y la liberación de un producto seguro, estable y eficaz.

## LISTA DE ABREVIATURAS

- X: Media de n determinaciones
- °C: Unidades de Temperatura (Grados Celsius)
- A: Unidades de absorbancia
- BSA: Albúmina Sérica Bovina
- BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio
- BPP: Buenas Prácticas de Producción
- CCD: Cromatografía de Capa Delgada
- CCDAR: Cromatografía de Capa Delgada de Alta Resolución
- CECMED: Centro para el control estatal de la calidad de los Medicamentos
- CG: Cromatografía Gaseosa
- CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución
- CR: Máxima diferencia permisible entre réplicas o rango crítico
- D.O: Densidad óptica
- DO<sub>1</sub>: Densidad óptica de la fracción 1 (lípidos neutros)
- DO<sub>2</sub>: Densidad óptica de la fracción 2 (lípidos disaturados)
- DO<sub>t</sub>: Densidad óptica total DPPC: Dipalmitoilfosfatidilcolina
- DS<sub>b</sub>: Desviación estándar de los resultados de n determinaciones del blanco
- EC: Electroforesis Capilar
- ECH: Comunidad Europea de Química Clínica
- FI: Fase inferior
- FM<sub>1</sub>: Primera fase móvil
- FM<sub>2</sub>: Segunda fase móvil
- FS: Fase superior
- g: Unidades de masa (gramos)
- GC: Gestión de Calidad
- HPTLC: Siglas en Inglés de Cromatografía de capa delgada de alta resolución

Lista de abreviaturas

I-D: Investigación- Desarrollo

IEC: Siglas en Inglés de la Comisión Internacional de Electrotécnicas

ISO: Siglas en Inglés de la Organización Internacional de Armonización

I<sub>2</sub>: Yodo sublimado

LD: Límite de detección

LDC: Límite de detección cualitativo

LPC: Lisofosfatidilcolina

LQ: Límite de cuantificación

M: Unidades de Concentración Molar (Molar)

MA: Método analítico

mg: Unidades de masa (miligramos) equivalente a 10<sup>3</sup> gramos mL: Unidades de volumen (mililitro)

MRC: Material de Referencia Certificado

MRI: Material de Referencia Interno

MRIB: Material de Referencia Interno Biológico

ng: Unidades de masa (nanogramos) equivalente a 10<sup>-9</sup> gramos

NC: Norma Cubana

NISBC: Instituto Nacional de estándares y controles biológicos de Inglaterra

NIST: Instituto Nacional de estándares de Estados Unidos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PC: Fosfatidilcolina

PE: Fosfatidiletanolamina

PG: Fosfatidilglicerol

PI: Fosfatidilinositol

PL: Fosfolípidos

PS: Fosfatidilserina

r.p.m: Unidades de velocidad de centrifugación (revoluciones por minutos)

R<sub>f</sub>: Movilidad relativa de los componentes en cromatografía

Lista de abreviaturas

RSD: Desviación estándar relativa o Coeficiente de Variación

S: Estimador de la desviación estándar

SDRA: Síndrome de Dificultad Respiratoria Agudo

SDRN: Síndrome de Dificultad Respiratoria del Recién Nacido

S<sub>i</sub>: Desviación estándar de precisión en condiciones intermedias

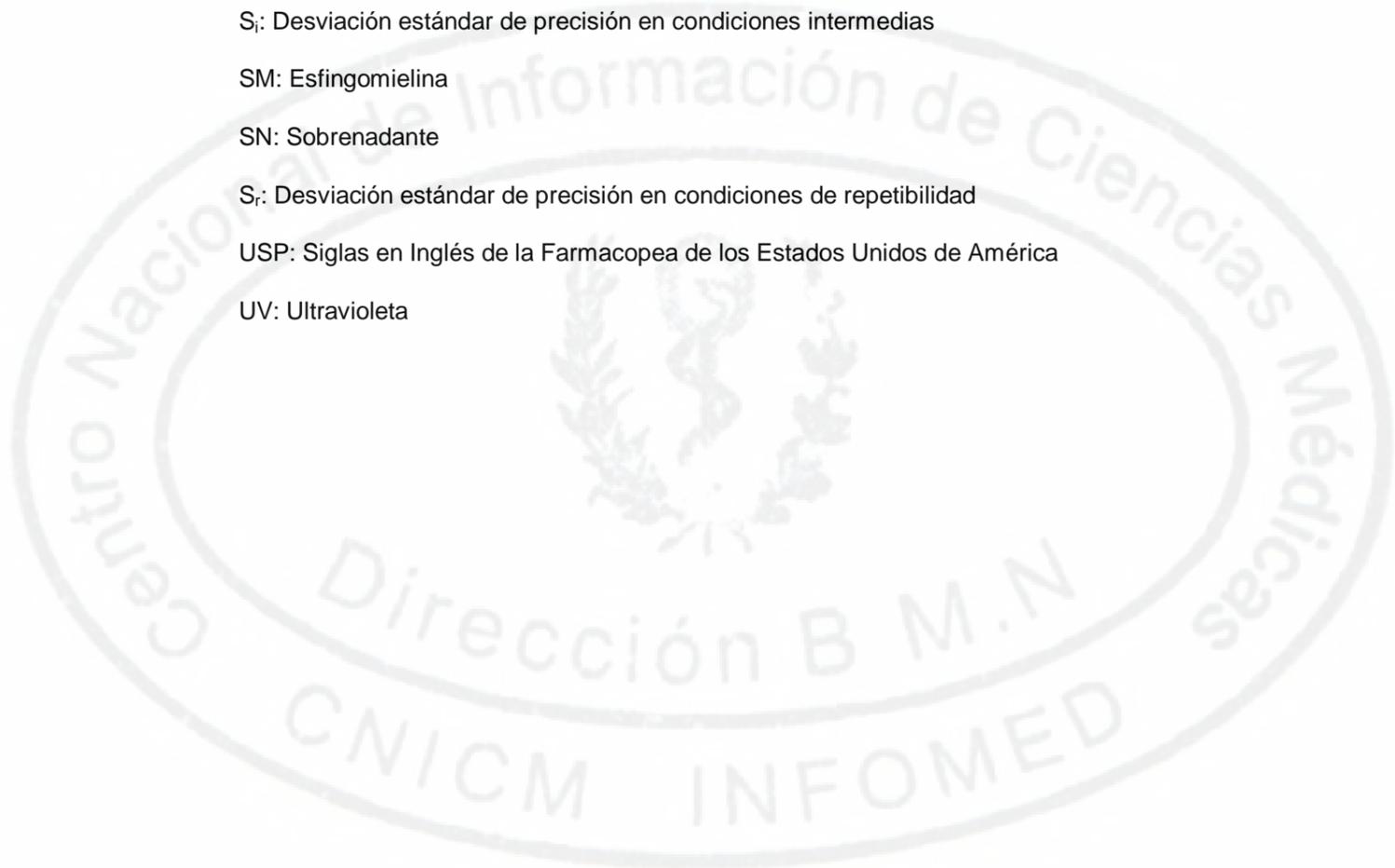
SM: Esfingomielina

SN: Sobrenadante

S<sub>r</sub>: Desviación estándar de precisión en condiciones de repetibilidad

USP: Siglas en Inglés de la Farmacopea de los Estados Unidos de América

UV: Ultravioleta





## INDICE

	Pág
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 1- REVISION BIBLIOGRAFICA .....	6
1.1- Características generales del surfactante pulmonar .....	6
1.1.1- Composición bioquímica .....	6
1.1.2- Función y uso .....	7
1.2- Fuentes de obtención y métodos de extracción de surfactantes exógenos.....	9
1.3- Surfactantes introducidos con éxito en la clínica y en fase de I + D .....	11
1.4- Características generales de los fosfolípidos .....	13
1.4.1- Propiedades y estructura de los fosfolípidos .....	13
1.4.2- Extracción y fraccionamiento de los fosfolípidos .....	15
1.4.3- Métodos alternativos y complementarios para el análisis de especies moleculares de fosfolípidos .....	15
1.5- Gestión de calidad en los laboratorios de ensayos .....	19
1.5.1- Control interno de la calidad en los laboratorios de ensayos analíticos .....	19
1.5.2- Validación de métodos analíticos.....	21
1.5.2.1 - Requisitos de validación.....	23
1.5.3- Materiales de referencia.....	26
CAPITULO 2- MATERIALES Y METODOS.....	29
2.1- Validación de los métodos analíticos .....	30
2.1.1- Cuantificación de fosfolípidos totales.....	30
2.1.2- Separación y cuantificación de fosfolípidos disaturados .....	33
2.1.3- Identificación y cuantificación de fosfolípidos por cromatografía en capa delgada (CCD).....	36
2.1.4- Estandarización, optimización y validación de un método de análisis de fosfolípidos por CLAR .....	38

2.2- Obtención y caracterización de Materiales de Referencia	
Internos .....	42
2.2.1- Evaluación de dos fuentes de obtención de fosfolípidos para la producción del MRI.....	42
2.2.2- Obtención y caracterización del MRI para métodos bioquímicos.....	43
2.2.2.1- Obtención de los lotes de MRI .....	43
2.2.2.2- Caracterización del MRI candidato .....	44
2.2.3- Elaboración y caracterización del Material de Referencia Interno Biológico de fosfolípidos para método biológico (MRIB).....	45
2.2.3.1- Obtención de los lotes de MRIB.....	45
2.2.3.2- Caracterización del MRIB candidato.....	46
<b>CAPITULO 3- RESULTADOS Y DISCUSION</b>	
3.1- Validación de los métodos analíticos .....	47
3.1.1- Cuantificación de fosfolípidos totales .....	47
3.1.2- Separación y cuantificación de fosfolípidos disaturados .....	50
3.1.3- Identificación y cuantificación de fosfolípidos por CCD .....	54
3.1.4- Estandarización, optimización y validación del método cualitativo y cuantitativo de análisis de fosfolípidos por CLAR .....	58
Conclusiones parciales .....	63
3.2- Obtención y caracterización de Materiales de Referencia Internos .....	63
3.2.1- Evaluación de las fuentes de materia prima .....	63
3.2.2- Obtención y caracterización del MRI para métodos bioquímicos.....	67
3.2.2.1- Obtención de los lotes de MRI .....	67
3.2.2.2- Caracterización de los lotes de MRI.....	68
3.2.3- Elaboración y caracterización del MRIB.....	75
3.2.3.1- Obtención de los lotes de MRIB .....	75
3.2.3.2- Caracterización del MRIB candidato .....	76
Conclusiones parciales .....	79
Capítulo 4- Estudio de factibilidad económica.....	80
DISCUSION GENERAL.....	84
CONCLUSIONES .....	90
RECOMENDACIONES.....	91

BIBLIOGRAFIA

ANEXOS





# **INTRODUCCION**

## INTRODUCCION

Un aspecto importante a tener en cuenta para garantizar la competencia en los laboratorios de ensayos, es la calidad analítica de los métodos que se utilizan, para lo cual la norma que establece los requisitos para la acreditación, la NC ISO/IEC 17025 (2000), recomienda una selección adecuada de los ensayos de forma que satisfagan, en primera instancia, las necesidades del cliente y resulten apropiados para lograr los objetivos previstos; los cuales preferiblemente deben ser métodos analíticos (MA) publicados como normas internacionales, regionales o nacionales.

Pero una realidad se impone, y está relacionada con la falta de disponibilidad de MA oficiales para la gran variedad de objetos de análisis, que cada día se incrementa con una tendencia en correspondencia con lo infinito de la realidad; por lo que muchas veces es imprescindible el uso de MA no cubiertos por especificaciones normalizadas, para estos casos la NC ISO/IEC 17025 plantea que este tiene que ser validado previamente, para confirmar que los mismos se ajustan al uso previsto.

Existen varias técnicas para validar un MA, las que se utilizan de forma independiente o combinada, en dependencia del método, su complejidad, el propósito para el cual se usa, entre otros; estos pueden ser: calibraciones utilizando patrones o materiales de referencia, comprobación de los resultados alcanzados con otros métodos, comprobaciones interlaboratorios, evaluación sistemática de los factores que influyen en los resultados, evaluación de la incertidumbre de los resultados basada en la comprensión científica de los principios teóricos del método y de la experiencia práctica, entre otras. Este proceso, además, constituye siempre un balance entre los costos, los ( riesgos y las posibilidades técnicas que ofrecerá el método analítico.

Otras de las medidas para asegurar la calidad de los resultados de los MA es el uso de materiales de referencia, lo cual es una necesidad no solamente para la evaluación de la exactitud de los métodos de ensayos en el proceso de validación, sino una herramienta para el control de la calidad analítica diaria, una vez que el método ya ha sido establecido.

Es por esta razón que el avance y la diversidad de tecnologías en la evaluación de productos farmacéuticos, ha impulsado la aparición en el mercado de un gran número de Materiales de Referencia Certificados (MRC) (NC ISO Guía 33, 2000), por organizaciones internacionales reconocidas (NIST, USP, NIBSC). Sin embargo, el elevado costo de estos no permite su adquisición para uso de rutina en el control de calidad; además, la diversidad de productos y ensayos imposibilitan la existencia de todos los MRC necesarios, es por ello que la tendencia en la mayoría de los laboratorios encargados de

## Introducción

evaluar productos, es a elaborar sus propios Materiales de Referencia Internos (MRI). La forma de evaluar estos materiales puede ser por el laboratorio individual o en forma cooperada usando estudios interlaboratorios, en todos los casos si existe un material certificado deben realizarse pruebas de contrastación entre el material interno y el certificado.

La elaboración de un MRI requiere del cumplimiento de los requisitos planteados en las Normas ISO e Informes Técnicos emitidos por la OMS para materiales de referencia químicos y biológicos (OMS, Technical Report Series, No. 822, 1992; No. 840, 1994). Esto demanda un gran esfuerzo del laboratorio productor para cumplir el mínimo de ensayos requeridos para demostrar la validez del MRI, e impone un costo significativo de recursos materiales y humanos, por lo que el aspecto económico debe ser considerado al establecer la necesidad de elaborar un MRI. Sin embargo, la confianza que brinda este material al resultado del ensayo, ha contribuido al auge de que en muchos laboratorios se elaboren sus propios MRI, los cuales son imprescindibles para el control de la calidad de los productos. Por otra parte, la actividad de Materiales de Referencia, donde se incluye el personal que atiende el manejo y control de los materiales, son aspectos que están contenidos en la Regulación 37 del CECMED, que rige la aplicación de las Buenas Prácticas de Laboratorio en los laboratorios de control de medicamentos (Regulación 37, 2004).

El Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, fundado en 1980, tiene como misión actual la de " *Contribuir a preservar la salud animal, vegetal y humana* ", para lo cual ha desarrollado varias líneas de investigación, insertadas en un nuevo modelo institucional de Investigación- Desarrollo; dentro de las cuales resalta por su impacto económico y social, la relacionada con el programa de medicamentos para uso humano, de donde se ha derivado como uno de los resultados más relevantes la obtención en 1989 de un surfactante natural exógeno, elaborado a partir de pulmón porcino, el cual se emplea con una alta eficacia en el tratamiento del Síndrome de Dificultad Respiratoria del Recién Nacido (SDRN), avalado por tres ensayos clínicos en Cuba, Chile y México, y por más de 10 años en la práctica médica cubana (Moreno y col., 1994; Manzanares y col., 1997). Este tiene la ventaja con respecto a otros surfactantes que se comercializan, de ser completamente natural y ofrecer precios más bajos. Fue aprobada su patente en Cuba y España, y está registrado por el CECMED desde 1997.

Debido a la importancia económica del producto, la complejidad de la vía de administración (instilación endotraqueal), así como el tipo de población a la que va dirigida su uso, se hace necesario extremar los controles de calidad al producto final,

## Introducción

siendo de obligatorio cumplimiento el uso de métodos validados, así como el empleo de materiales de referencia que den confiabilidad a los resultados.

Los componentes mayoritarios de este producto son los fosfolípidos y dentro de ellos la fosfatidilcolina (PC) es la que se encuentra en mayor proporción, constituyendo la fracción disaturada, la fracción activa de este producto biológico (Holm y col., 1997). De ahí que en el control del producto final se desarrollen un grupo de técnicas encaminadas a conocer el contenido total de fosfolípidos, así como a identificar y cuantificar los diferentes fosfolípidos componentes, prestando especial atención a la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) como principio activo principal, la PC como componente mayoritario y la LPC como elemento tóxico que debe encontrarse en pequeñas cantidades menores de 10 mg/ kg de peso (Grossmann y col., 1999).

Entre los métodos para el análisis de productos biológicos con contenido de fosfolípidos está la cromatografía de capa delgada (CCD) (Touchstone y col., 1980; Lendrath y col., 1991; Mallinger y col., 1994; Miwa y col., 1996; y Hiroshi y Magobei, 1996) , la cual a pesar de ser muy utilizada para la identificación y cuantificación de estos compuestos, presenta desventajas como: la variabilidad de los resultados ( $r_i$ ) por la fácil afectación del sistema cromatográfico por factores ambientales como la humedad y la temperatura, la gran manipulación a que se someten las muestras al ser imprescindible el raspado de cada una de las manchas para su posterior cuantificación por espectrofotometría, un tiempo de análisis prolongado lo que aumenta los costos de calidad del producto por concepto de salarios, alta probabilidad de contaminación de las muestras, etc.; lo que hace imprescindible el uso de materiales de referencia como controles internos del ensayo como vía de disminuir la incertidumbre y aumentar la confianza del resultado. Su uso logra disminuir el número de repuebas, al eliminar la duda sobre los resultados obtenidos y se toma la decisión de aceptar o rechazar con mayor confianza, esto se traduce finalmente en una reducción de los costos de calidad del producto, disminuyendo las quejas y reclamaciones por no cumplimiento de los requisitos de calidad, contribuyendo al acatamiento de las regulaciones nacionales e internacionales que facilitan los trámites de registro y comercialización de este producto.

La utilización de un MRC resulta costoso para uso de rutina, por lo que su empleo es factible en las etapas de investigación del producto, así como para la contrastación de los MRI, pero no en el análisis de la calidad de las producciones lote a lote.

La situación existente apunta a la elaboración de MRI, que no resultan muy costosos y pueden producirse en las cantidades requeridas para los ensayos de rutina. Es común en las producciones farmacéuticas tomar un lote, que cumpla muy bien con las especificaciones, como MRI. Sin embargo, en el caso del SURFACEN, esta práctica no

## Introducción

es posible, debido a la poca disponibilidad de la fuente animal de la que se obtiene el producto. Esto establece la necesidad de buscar fuentes alternativas para la obtención de estos MRI, y definir metodologías alternativas propias para su producción. No obstante, debe demostrarse que los MRI así obtenidos son apropiados para el uso que se recomienda debido a que se debe considerar la influencia de la diferencia de las matrices y de estas metodologías de producción.

Por esta razón, partiendo de conocimientos previos (Cockshutt y Posmayer, 1992; Daniels y col., 1995), acerca de que las características fundamentales de la composición bioquímica del surfactante pulmonar están conservadas en diferentes especies estudiadas (hombre, cerdo, rata, oveja, pollo), y que difiere de la composición fosfolipídica de otros órganos, fundamentalmente, en la proporción de los diferentes constituyentes, nos trazamos la siguiente hipótesis:

### **Hipótesis:**

*Materiales de Referencia Internos elaborados a partir de fuentes y metodologías alternativas a la que se emplea para la obtención del SURFACEN, reúnen los requisitos para ser utilizados en el control interno de los métodos de análisis bioquímicos y biológico del producto.*

### **Objetivo general:**

- Obtener y caracterizar Materiales de Referencia Internos para el control de los ensayos bioquímicos y biológicos de evaluación del producto, a partir de una fuente alternativa al pulmón porcino.

Por tal motivo los **objetivos específicos** del trabajo son:

- Diseñar y ejecutar la validación de los métodos bioquímicos utilizados en el control de la calidad del SURFACEN, y en la caracterización de los Materiales de Referencia Internos de fosfolípidos, para garantizar la confiabilidad de los resultados y la liberación de un producto seguro, estable y eficaz.
- Estandarizar, optimizar y validar un método alternativo, más rápido y simple, de análisis de fosfolípidos por CLAR.

## Introducción

- Evaluar dos fuentes alternativas al pulmón porcino (pulmón y placenta de conejos), como materia prima para la obtención de Materiales de Referencia Internos de fosfolípidos, y definir las tecnologías adecuadas para la obtención de las matrices fosfolípídicas requeridas.
- Elaborar Materiales de Referencia Internos (MRI) de fosfolípidos, para el control de la calidad analítica de los ensayos de cuantificación de los principios activos y productos de degradación del surfactante natural pulmonar *SURFACEN*, así como para el control interno del método de actividad biológica de gazapos inmaduros (MRIB).

Al cumplimentar los objetivos trazados en el presente trabajo se habrán aportados los siguientes aspectos novedosos:

- Dos Materiales de Referencia no existentes en el mercado para el control interno de los métodos bioquímicos, y como control positivo del método biológico de evaluación de la actividad surfactante.
- Dos tecnologías para la obtención de Materiales de Referencias Internos a partir de pulmones de conejos, con probada consistencia y factibilidad económica.
- Nuevo sistema analítico validado para el análisis de fosfolípidos por CLAR, más simple y rápido que el método convencional empleado en la industria de surfactante mundial, que permite la separación y cuantificación relativa del principio activo y el producto de degradación del medicamento.



# ***CAPITULO 1***

## 1. REVISION BIBLIOGRAFICA

### 1.1- Características generales del surfactante pulmonar

#### 1.1.1- Composición bioquímica

Desde que Pattle en el año 1955 y Clements en el 1956 reportaron la existencia de una sustancia en el pulmón capaz de disminuir la tensión superficial denominada surfactante pulmonar, y Avery y Meal tres años después señalaron que el déficit de esta sustancia es la causa fundamental del Síndrome de Deficiencia Respiratoria Neonatal (SDRN), creciente han sido las investigaciones en el campo de los surfactantes pulmonares que conllevaron a una revolución en el tratamiento de esta y otras afecciones respiratorias graves.

El surfactante pulmonar es una mezcla compleja, de naturaleza heterogénea, la cual se encuentra recubriendo el epitelio alveolar y su propiedad fundamental es estabilizar los alvéolos pulmonares al formar una monocapa capaz de reducir la tensión superficial, de forma dependiente del área en la interfase aire - líquido de estas estructuras que constituyen las denominadas vías aéreas terminales (Rauprich y col., 2000).

Varios son los trabajos que han demostrado que las características fundamentales de la composición bioquímica del surfactante pulmonar natural están conservadas, en gran medida, en diferentes especies estudiadas tales como: hombre, rata, oveja, pollo, conejo, etc., y difiere de la composición fosfolípida de otros órganos (Cockshutt y col., 1991; Daniels y col., 1995; Travieso y col., 2001).

Este sistema presenta una composición bioquímica aproximadamente de un 90% de lípidos, dentro de los que predominan los fosfolípidos (80%), entre los cuales los componentes más abundantes son la fosfatidilcolina disaturada (DPPC) y el fosfatidilglicerol (PG) (Holm y col., 1997); de un 10% de proteínas entre las que están las proteínas surfactantes A (SPA), B (SPB), C (SPC) y D (SPD), así como algunas proteínas contaminantes como la albúmina (Cockshutt y col., 1991; Goerke, 1998).

A nivel del surfactante natural, también, hay presencia de componentes grasos como los acilglicéridos y el ácido palmítico (Cockshutt y col., 1991; Jobe, 1993; Clements y Avery, 1998), que no siempre son considerados indeseables ya que mejoran algunas propiedades de los surfactantes, ejemplo de ello es que estas sustancias han sido utilizadas para enriquecer a diversos surfactantes naturales como el desarrollado en Japón conocido como *Surfacten* (surfactante TA, Tokyo Tanabe, Tokyo) y su variante americana *Survanta* (Beractant, Ross Laboratorio, Columbus, Ohio), y otros artificiales como el *Exosurf* que contienen al ácido palmítico en forma de palmitato de colfoscerilo, y el *Venticute* que lo

contiene en un 2 % (Taeush y col., 2002; Vademécum 2004; Robertson y col., 2000), a pesar de que el rápido metabolismo del ácido palmítico en el pulmón determina que este no contribuya por mucho tiempo al mejoramiento de la capacidad tensoactiva del surfactante "in vivo", al menos de forma directa. La presencia de colesterol en proporciones mayores de un 10 % actúa como un inhibidor de la actividad surfactante (Yu y Possmayer, 1994).

La DPPC constituye del 70 al 75 % de la fracción de fosfatidilcolina en el lavado broncoalveolar y en cuerpos lamelares (Holm y col., 1996), conformando el principal componente del sistema surfactante pulmonar, a la cual se le atribuye la propiedad de alcanzar bajas tensiones superficiales (Van Golde, 1996). Hace unos años se ha demostrado la implicación de los ácidos grasos saturados de la DPPC con un efecto protector contra el daño pulmonar causado por especies reactivas de oxígeno (Rudiger y col., 1998).

Para que la DPPC alcance la interfase aire- líquido, donde realiza su función, es necesario la presencia de lípidos y otras sustancias que faciliten su rápida adsorción y distribución como una monocapa, sin interferir en su habilidad de disminuir la tensión superficial a valores cercanos a cero en la compresión (Perkins y col., 1996). Se conoce que los fosfolípidos aniónicos como el fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilglicerol (PG), y las proteínas asociadas al surfactante contribuyen a ese objetivo (Lopatko y col., 1998). La temperatura de transición del estado gel cristalino al estado líquido para la DPPC es elevada (41 °C) comparada con la del resto de los fosfolípidos del surfactante, debido precisamente a la rigidez que le confiere la presencia de los dos ácidos grasos saturados (Goerke y Gonzáles, 1981). Esto significa que a la temperatura corporal la DPPC se encuentra en estado gel cristalino, lo cual determina la capacidad de alcanzar muy bajas tensiones superficiales cuando este fosfolípido se incorpora a la interfase.

Del surfactante pulmonar se han aislado otros componentes fosfolipídicos que constituyen contaminantes procedentes de las biomembranas como la esfingomielina (SM) y la fosfatidiletanolamina (PE) (Holm y col., 1997); así como la lisofosfatidilcolina (LPC), producto de degradación hidrolítica de la fosfatidilcolina, la cual es tóxica a dosis superiores a los 10 mg/ Kg de peso por provocar la inactivación del surfactante y aumentar la permeabilidad pulmonar, por lo que es un elemento poco deseado en las preparaciones de surfactantes pulmonares (Grossmann y col., 1999; Travieso y Fraga; 2001).

### **1.1.2- Función y uso**

Se plantea que dentro de las propiedades biofísicas de un surfactante pulmonar están: la capacidad de adsorción de la sub-fase a la interfase; la capacidad de disminuir la tensión

superficial efectiva durante la compresión dinámica; y de reexpandirse luego del colapso de la monocapa al final de la compresión dinámica, así como la capacidad de variar la tensión superficial durante la compresión y expansión dinámica (Notter, 1989). Este autor, relaciona estas propiedades con los efectos biológicos de disminuir el trabajo respiratorio; aumentar la estabilidad alveolar; contrarrestar el edema pulmonar y permitir un reclutamiento alveolar más uniforme durante la inspiración. Similares funciones fueron señaladas por Jobe (1993).

Para desarrollar su función los componentes del surfactante deben ser sintetizados en el retículo endoplasmático de los neumocitos tipo II (Keough, 1992), procesados y empaquetados dentro de los cuerpos lamelares donde son almacenados en forma de bicapa. Los cuerpos lamelares son secretados en la hipofase alveolar y reorganizados para formar una monocapa activa (Van Golde, 1996).

Debido al importante papel que juega todo este sistema en la fisiología pulmonar, su disfunción es causa de importantes trastornos. Esta disfunción puede producirse por causas primarias, como el síndrome de dificultad respiratoria del recién nacido (SDRN), que ocurre en niños prematuros debido a la incapacidad de los neumocitos tipo II de sintetizar los componentes del surfactante, lo cual constituye una causa importante de mortalidad y morbilidad neonatal, incluso en países desarrollados (Chida y Fujiwara, 1996; Robertson y col., 2000; Alien y col., 2001).

Actualmente continúan los estudios para esclarecer los mecanismos de inhibición de la actividad surfactante. Hace algunos años se demostró el efecto inhibitorio de las especies reactivas de oxígeno sobre la función surfactante (Amirkhanian y Merrit, 1998; Anderson y col., 1999).

Otra causa de disfunción del sistema surfactante pulmonar se manifiesta en el síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), que se caracteriza por una severa hipoxemia arterial, provocada por diversos factores tales como la falta de componentes activos del surfactante o cambio en sus proporciones debido a la disminución de su síntesis o liberación; inhibición de la función del surfactante por la entrada de proteínas plasmáticas (Lewis y Veldhuizen, 2003); daño o inhibición de componentes del surfactante por mediadores de la inflamación como proteasas, agentes oxidantes y otros lípidos como lisofosfatidilcolina (Rudiger, 1998; Taeusch y col., 2002). Es por ello, que en los últimos años el surfactante exógeno se ha convertido, conjuntamente con otras medidas terapéuticas, en un medicamento importante en el tratamiento de diversas afecciones como el SDRN, SDRA, neumonía, asma bronquial, asfixia del neonato, así como en la terapia del síndrome de aspiración del meconio (Findlay y col., 1996; Morón y col., 1996; Shepens y col., 1996), por lo que la eficacia comprobada de este tipo de

preparación, ha conllevado a un incremento de las investigaciones para la búsqueda de nuevos medicamentos.

En la actualidad el surfactante pulmonar exógeno es reconocido como una categoría terapéutica, además, es un medicamento moderno que hasta hace sólo unos años solo se producía y comercializaba por grandes compañías (Glaxo-Wellcome, Chiesi, Tokyo Tanabe, Discovery laboratorios, etc.), en los tres principales mercados farmacéuticos mundiales: América del Norte, Europa y Japón (Valdés y Cruz, 1998), recientemente se ha reportado la investigación de nuevos productos en México y Brasil (Arcas y col., 2002). Los métodos de preparación de los naturales se basan en la obtención del extracto lipídico del surfactante natural de diferentes especies, pero los procedimientos y las fuentes varían dando lugar a surfactantes con diversas composiciones bioquímicas, aunque todos contienen cantidades considerables de DPPC y proteínas hidrófobas.

#### **1.2- Fuentes de obtención y métodos de extracción de surfactantes exógenos**

El sistema surfactante natural es vital en el mantenimiento de la función pulmonar apropiada, su alteración contribuye al desarrollo de la patofisiología pulmonar (Van Golde, 1996). Es por esta razón que a través de los años se ha estado trabajando en la obtención de surfactantes naturales extraídos de fuentes bovinas y porcinas así como surfactantes artificiales.

Durante la década del 70 se sentaron las bases para la utilización del surfactante natural en la terapia de reemplazo para el tratamiento efectivo del SDRN (Amato y col., 2003), pero los surfactantes obtenidos perdían su actividad durante la esterilización por calor y tenían el inconveniente de contener proteínas contaminantes lo cual elevaba su carácter antigénico (Enhoring, 1997).

Un paso importante fue dado por Fujiwara y col. en 1980, quienes obtuvieron mediante la extracción con solventes orgánicos, el primer surfactante pulmonar (origen bovino), lo cual dió lugar a una preparación que sólo contenía fosfolípidos, lípidos neutros y las proteínas hidrófobas asociados al surfactante. Este producto fue probado en la clínica con éxito, constituyendo el primer surfactante exógeno de eficacia comprobada, conocido como *TA* o *Surfacten* (Fujiwara y col., 1980). Después de los resultados obtenidos con el *TA*, se desarrollaron otros surfactantes naturales heterólogos a partir de las especies bovinas y porcinas, *Survanta*, *Curosurf*, *Alveofact*, *CLSE*, reportándose numerosos trabajos que confirman su eficacia en el tratamiento del SDRN (Rodgers, 1994; Wiseman y Bryson, 1994; Morón y col., 1996; Taeush y col., 2002).

El surfactante natural puede ser obtenido por extracción del contenido del saco pulmonar con soluciones electrolíticas (Manzanares y col., 1997), lo que se conoce como lavado pulmonar; o por el procesamiento de los pulmones enteros, los cuales son triturados y el surfactante es extraído, entonces, con soluciones electrolíticas (Fujiwara y col., 1982; Robertson y Curstedt, 1988; Díaz, 1999).

El método de obtención por lavado pulmonar tiene la ventaja de ser sencillo y el material de partida está poco contaminado con otros lípidos que no tienen acción surfactante, tal es el caso de varios surfactantes como: *Surfacen*, *Infasurfy Alveofact*. Cuando el surfactante es obtenido a partir de pulmones triturados, es necesario un proceso de purificación más riguroso, ya que el material original tiene un mayor contenido de fosfolípidos de membranas y consecuentemente menor concentración relativa de DPPC (Kattwinkel, 1998). Este es el caso del surfactante, mencionado anteriormente, desarrollado en Japón, *Surfacten*, (Tokyo Tanabe) y que posteriormente fue probado y aprobado su uso en los Estados Unidos como *Survanta* (Abbot). En esta patente (Fujiwara y col., 1982) el método de obtención se basa en la lixiviación de los pulmones triturados con solución salina a bajas temperaturas por 30- 120 minutos, seguido de una filtración a presión y dos etapas de centrifugación, posteriormente el sedimento obtenido se concentra o seca mediante liofilización para precipitarlo con acetona fría durante 30-60 minutos, dicha suspensión se filtra y el material insoluble se extrae con mezcla cloroformo- metanol (2:1), el extracto rico en surfactante se seca y se diluye en agua estéril y se le adiciona DPPC, ácido palmítico y triglicéridos.

Otro surfactante obtenido de pulmones triturados enteros, en este caso de cerdos, es el *Curosurf*, que después de la separación por centrifugación y la extracción con mezcla cloroformo- metanol (2:1), utilizan una etapa de separación cromatográfica para la eliminación de los lípidos neutros, en una columna de fase reversa LIPIDEX- 500 (Robertson y Curstedt, 1988; Kattwinkel, 1998) con el fin de elevar el constituyente fosfolipídico. Este método de purificación tiene el inconveniente de que a gran escala consume grandes cantidades de solventes orgánicos clorados, a pesar de lo cual no logra elevar el contenido de DPPC que es bajo (33%).

La extracción con fluidos supercríticos es un método alternativo y efectivo para la purificación de sustancias naturales, entre ellos, el surfactante pulmonar. Este método se ha empleado para la purificación de surfactante pulmonar porcino; con él, se obtiene una composición bioquímica adecuada y se reduce considerablemente el consumo de solventes orgánicos (Chiesi y col., 1994). Este método tiene la desventaja de que es necesario altas presiones (180- 300 atmósferas), por lo que requiere de un equipamiento que permita dicho régimen de presiones.

Con el objetivo de evadir las extracciones y contaminaciones durante los procedimientos de preparación, y debido a las dificultades con las materias primas fundamentales de origen animal, se han desarrollado surfactantes artificiales, como por ejemplo Exosurf, ALEC, los cuales han tratado de sustituir a los naturales, aunque hasta el momento no lo han logrado, debido a que la respuesta clínica al tratamiento con surfactantes naturales que contienen las proteínas hidrófobas SP-B y SP-C es mucho más rápida que cuando se realiza el tratamiento con surfactantes artificiales que no las contienen (Jobe, 1993; Johanson y col., 1994; Solí, 1998; Halliday, 1996; y Lewis, 2004).

Para el tratamiento del SDRN en Cuba fue elaborado un surfactante obtenido del extracto lipídico de lavado pulmonar porcino llamado *SURFACEN*, como parte del desarrollo del programa neonatal del MINSAP. Este producto ha demostrado su efectividad y eficacia en los estudios clínicos realizados en Cuba, Chile y México (Moreno y col., 1994; Rybert y col., 1996).

El *SURFACEN* reúne las características bioquímicas generales de los surfactantes naturales heterólogos empleados en la clínica (Manzanares, 1995), como son un alto contenido de fosfatidilcolina y la presencia de las proteínas hidrófobas SP-B y SP-C. Su composición bioquímica se caracteriza, además, por un elevado contenido de fosfolípidos aniónicos comparado con otros surfactantes, con predominio de fosfatidilinositol sobre fosfatidilglicerol, además, también presenta fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, esfingomielina y bajas concentraciones de lisofosfatidilcolina (Manzanares y col., 1997). Este surfactante disminuye de forma efectiva la tensión superficial mínima, tiene la capacidad de adsorción y redistribución en la interfase y es capaz de variar la tensión superficial en función del área, lo que permite un buen volumen de expansión y retención de aire durante la deflación.

Este producto da lugar a nuevas perspectivas de investigación en otras enfermedades como es el caso del SDRA, aspiraciones meconiales, asma, trasplante pulmonar, neumonías, entre otros.

### **1.3- Surfactantes introducidos con éxito en la clínica y en fase de I - D**

Entre los surfactantes que se encuentran actualmente en la clínica se encuentran entre los naturales el ***Survanta* o *Beractant*** (Surfactante natural modificado), aprobado por la FDA 1991 y comercializado por Ross laboratories, considerado como el estándar en la terapia surfactante, que consiste en un extracto de pulmón bovino que contiene fundamentalmente fosfolípidos (50- 60 % de los PL totales aparecen como DPPC), además contiene 0.5- 2.5 % de proteínas lipofílicas (SP-B, SP-C), y no contiene SP-A ni preservos. Este surfactante se

obtiene mediante una extracción con cloroformo del tejido pulmonar bovino triturado, seguido de una reducción del colesterol (usando etilacetato), posterior adición de DPPC, ácido palmítico y tripalmitina. El extracto bovino de surfactante es esterilizado en autoclave y almacenado con N<sub>2</sub> a - 20 ° C, durante 6 meses (Anónimo, 2001; Lewis, 2004; Vademécum, 2004).

Otro surfactante natural es el **Curosurf** (Surfactante natural no modificado), comercializado por Chiesi Farmaceutici, Pharma Italy, es obtenido de pulmón de cerdo, compuesto fundamentalmente por fosfolípidos y las proteínas lipofílicas (SP-B, SP-C), no contiene SP-A ni preservos. Se obtiene mediante extracción con cloroformo metanol a partir del pulmón triturado y purificado por cromatografía líquida para eliminar los lípidos neutros (Anónimo, 2001; Lewis, 2004).

El **Infasurf** o **CLSE** (Surfactante natural sin modificar) está compuesto por un extracto surfactante de pulmón de ternero que contiene fundamentalmente fosfolípidos, no contiene preservos. Se obtiene mediante extracción con cloroformo a partir del lavado pulmonar. Otros surfactantes naturales comercializados actualmente son el **Natsurf**, el **Alveofact** (Boehringer Ingelheim SA), y el **Babyfact B** que es un surfactante pulmonar bovino modificado con una composición de 30 mg de fosfolípidos totales, Na Cl 9 mg, y agua para inyección es (Anónimo, 2001; Lewis, 2004).

Por otra parte, entre los surfactantes artificiales se destaca el **Exosurf** (surfactante sin proteínas) inventado por John Clements, fue el primer surfactante aprobado para uso clínico en los Estados Unidos, comercializado por Lab. Glaxo- Wellcome (Vademécum, 2004; Robertson y col., 2000), con una composición de palmitato de colfoscerilo 108 mg y Na Cl 18,4 mg/ vial, sin preservos, y cada mL contiene: 13,5 mg DPPC, 1,5 mg alcohol cetílico y 1 mg de tiloxapol.

Otro surfactante artificial que ha abierto nuevas perspectivas en este campo es el **KL4**, compuesto por DPPC, palmitoil- oleoyl fosfatidilglicerol, y el ácido palmítico combinados con un péptido sintético de 21 aminoácidos que simula las características estructurales de la SP- B, donde subunidades repetidas de una lysina y cuatro leucinas forman una hélice antipática. Además, se conoce el **Venticute** que es un surfactante artificial con proteínas que además contiene DPPC, PG y ácido palmítico en un 2 % (Robertson y col., 2000).

Una nueva vertiente de investigación en este campo está encaminada a la obtención de nuevos productos con esta actividad y que sean más resistentes a la inactivación por sustancias que conviven en los espacios alveolares (meconio, lípidos, suero, etc.), así como que proporcionen mayor resistencia a la inactivación por fosfolipasas que fundamente el uso de dosis más bajas para el tratamiento del SDRA (Taeush y col., 2002).

#### **1.4- Características generales de los fosfolípidos**

##### **1.4.1- Propiedades y estructura de los fosfolípidos**

Los fosfolípidos se encuentran en todas las formas de vida, poéticamente se dice que son el principal bloque en la construcción de la vida (Kidd, 2000), constituyen una gran clase dentro de los lípidos complejos. Son componentes principales de las membranas celulares, encontrándose solo una pequeña cantidad de ellos en otras localizaciones de las células. Son también conocidos como fosfoglicéridos o fosfátidos, aunque existen algunos como las esfingomielinas que se clasifican dentro de los esfingolípidos debido a la naturaleza del esqueleto al cual se halla unido el ácido graso. Muchos fosfolípidos pueden ser clasificados como nutrientes esenciales ya que son necesarios varios enzimas y cofactores para sus síntesis in vivo (Hames y col., 1998).

Estos compuestos son considerados ortomoléculas, como dijera el premio Nobel en bioquímica Linus Pauling en 1968 (citado por Kidd, 2000), son moléculas imprescindibles para el cuerpo, tienen una organización molecular única que probablemente hace que se desempeñen de forma integral para la vida desde el mismo comienzo de este proceso.

Los fosfolípidos puros son sólidos blancos de consistencia cerosa, pero por exposición al aire se oscurecen y experimentan cambios complejos a causa de la tendencia de sus ácidos grasos no saturados a peroxidarse por la acción del oxígeno atmosférico. Son solubles en muchos disolventes no polares que contengan cierta cantidad de agua, y son extraídos fácilmente de las células y los tejidos mediante mezclas cloroformo- metanol, y son insolubles en acetona anhidra (Hames y col., 1998).

Los fosfoglicéridos sufren diversos tipos de reacciones de degradación, destacándose las hidrólisis alcalina y enzimática, esta última por la acción de fosfolipasas específicas, las cuales han sido muy importantes para la determinación de la estructura de estos compuestos, mediante la cual dan lugar a lisofosfolípidos que son intermediarios del metabolismo de estos, y que solo aparecen en las células y en los tejidos en cantidades muy pequeñas, estos lisofosfolípidos en concentraciones elevadas son tóxicos y dañinos para las membranas al funcionar como moléculas arpones que afectan su estabilidad y permeabilidad (Díaz y col., 2001).

La fosfatidilcolina (PC), es usualmente el fosfolípido más abundante en las membranas de tejidos animales y es, a menudo, el componente lipídico principal de las membranas vegetales y de muchos microorganismos. Por el contrario la lisofosfatidilcolina (LPC) se encuentra en cantidades minoritarias en gran variedad de tejidos contiene una sola cadena de ácido graso en cada molécula, es el fosfolípido más soluble en agua, por lo que en

extracciones con solventes de diferentes polaridades, suele separarse en la fase más polar (hidroalcohólica). Es un inhibidor de la actividad surfactante por mecanismos que aún están en estudio (Anderson y col., 1999; Grossmann y col., 1999).

El ácido fosfatídico se encuentra solo en tejidos y en cantidades trazas, pero tiene una gran importancia metabólica como precursor de los restantes fosfolípidos. Es fuertemente ácido, y es aislado generalmente en forma de sales. El fosfatidilglicerol (PG) es igualmente un constituyente minoritario de tejidos y se le confieren importantes funciones en el surfactante pulmonar y en los cloroplastos de plantas. El difosfatidilglicerol (cardiolipina) está relacionado estructuralmente al PG, y es un constituyente abundante en tejidos mitocondriales, específicamente, en músculo de corazón. Estos fosfolípidos tienen propiedades ácidas (Hames y col., 1998).

La fosfatidiletanolamina (PE) (Cefalina) es frecuentemente el segundo tipo de fosfolípidos más abundante en tejidos animales y de plantas, y es la clase de lípidos más abundante en los microorganismos. Su grupo amino puede ser metilado enzimáticamente como parte de un proceso vital de la célula para rendir como metabolitos primarios fosfatidil-N- monometiletanolamina y fosfatidil-N,N-dimetiletanolamina y fosfatidilcolina como producto eventual.

La fosfatidilserina (PS) es un fosfolípido ácido que se encuentra en tejido de animales, plantas y microorganismos en forma de sal. A pesar de que todas las membranas biológicas contienen PS, este fosfolípido es más abundante en cerebro y células nerviosas constituyendo el 10- 20 % del contenido de fosfolípidos totales en el cerebro de mamíferos, encontrándose fundamentalmente en la cara interna de la bicapa lipídica. Su bioquímica ha sido muy estudiada (Hamilton y col., 2000) y recientemente se ha demostrado que su suplementación puede ayudar a retardar procesos degenerativos a nivel mental asociados con el envejecimiento, además de actuar como moléculas de señalización en la membrana, para diferentes caspasas involucrados en los mecanismos de apoptosis, así como en la activación de un número de enzimas involucradas en la función de las células cerebrales. El fosfatidilinositol (PI) presente en su forma ópticamente inactiva (myoinositol) es un constituyente de estos mismos tejidos. A menudo se encuentra en los tejidos animales acompañado de pequeñas cantidades de fosfatidilinositol-4-fosfato y fosfatidilinositol-4,5- bifosfato. Cada clase de fosfolípido, en un tejido, tiene una composición de ácidos grasos distintiva, probablemente muy relacionado a su función.

#### **1.4.2- Extracción y fraccionamiento de los fosfolípidos**

Para el análisis de muestras de fosfolípidos es necesario realizar, primeramente, extracciones para separarlos de sus matrices (tejidos, órganos), en un estado relativamente puro. Los fosfolípidos (constituyentes de las biomembranas) están en asociación con otros componentes como proteínas y polisacáridos, con los cuales interactúan, por lo que no se extraen de forma pura fácilmente. Generalmente estos compuestos están unidos por interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrogeno y/o enlaces iónicos; por lo que es necesario el uso de solventes que no solo disuelvan estos compuestos, sino que, además, los separen del tejido matriz (Christie, 1992).

Varios solventes o combinaciones de estos han sido sugeridos como extractores de fosfolípidos: isopropanol: hexano (2:3) (V/V), el cual es relativamente poco tóxico; cloroformo: metanol (2:1)(V/V) con el agua endógena del tejido matriz como componente ternario del sistema (Folch y col., 1957). Usualmente el tejido es homogeneizado en presencia de ambos solventes, pero se han obtenido mejores resultados si es extraído primeramente con metanol solo, seguido por la adición del cloroformo a la mezcla. Generalmente no es necesaria la aplicación de calor. También se ha reportado la extracción de fosfolípidos con hexano: metanol, para purificar esferoides de origen vegetal (Davis y col., 1993), lo que demuestra que la capacidad de extraerse de los lípidos es variable, y que existen muchos ejemplos de métodos de extracción alternativos y modificados que han sido usados con resultados positivos (Christie, 1992).

Estudios que han comparado tres métodos de extracción de fosfolípidos de fluido amniótico humano, han obtenido como resultados que los rendimientos de estos compuestos variaron considerablemente y fueron dependientes de la técnica de extracción utilizada, además, de observar diferencias en las composiciones bioquímicas de los extractos (Duck-Chong y col., 1984).

Otro método para la extracción es el uso de butanol saturado con agua, como una mezcla muy útil para romper la inclusión de complejos de fosfolípidos en almidón, siendo una de las vías que aporta mayor recobrado de fosfolípidos en cereales. Esta combinación de solventes ha sido recomendada, también, para la recuperación cuantitativa de, lisofosfolípidos (Christie, 1992).

En los últimos años se ha publicado la extracción de fosfolípidos de fluidos amnióticos mediante microcentrifugación selectiva a 10 000 g (Almog y col., 1996).

#### **1.4.3- Métodos alternativos y complementarios para el análisis de especies moleculares de fosfolípidos**

#### Revisión bibliográfica

Entre los métodos más utilizados para el análisis de productos biológicos con contenido de fosfolípidos está la cromatografía gaseosa (CG), la cromatografía en capa delgada (CCD) y la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Sewell, 1992; Christie, 1992; Wang y col., 2001; Suchocka y col., 2003; Murthy y col., 2002).

La CG permite separar e identificar los fosfolípidos, pero usualmente requiere laboriosos procedimientos de preparación de las muestras, además, estas pueden volatilizarse o descomponerse durante el desarrollo del método (Sewell, 1992; Christie, 1992).

La CCD es una alternativa muy útil para la identificación de diferentes compuestos por su simplicidad y bajo costo, permite detectar simultáneamente diferentes clases de fosfolípidos en una muestra única, requiere poca cantidad de muestra a aplicar; condiciones que siempre son deseadas en cualquier procedimiento analítico, por lo que en las investigaciones a escala de laboratorio esta técnica de cromatografía plana es una de las más utilizada, reportándose decenas de sistemas diferentes para el análisis de estos compuestos (Miwa y col., 1996; Alajos y Horvath, 2003; Wang, 2004). Sin embargo, este método presenta desventajas, pues puede haber una separación incompleta de algunos de los fosfolípidos durante una primera corrida y consumen mayor tiempo para lograr la separación con respecto a otras técnicas de alta resolución; además existe una gran variabilidad entre corridas debido a la influencia de factores ambientales como la temperatura, la humedad y la presión atmosférica.

La cromatografía de capa delgada de alta resolución (CCDAR) es una cromatografía que emplea un gradiente de saturación en la cámara cromatográfica. Requiere de pequeñas cantidades de muestras y además, el tiempo de desarrollo es rápido, lográndose buena separación y caracterización de los fosfolípidos (Bodil y col., 1999; Dittrich y Ulbrich, 2001; Koty y col., 2002; Hoek y col., 2003).

En los últimos años, se han reportado muchos artículos científicos utilizando el método de CLAR (Miwa y col., 1996; Murthy y col., 2002; Suchocka y col., 2003), cuya sensibilidad y , alto poder resolutivo, hace que permita separar, en corto tiempo, los diferentes fosfolípidos que se encuentran en una mezcla, permitiendo obtenerlos en diferentes fracciones que pueden ser identificadas con fines analíticos y también pueden ser concentradas para fines preparativos. La tecnología de separación y purificación de fosfolípidos en muestras biológicas por CLAR se ha diversificado en los últimos años, reportándose, varias decenas de sistemas de separación, en los cuales en dependencia de la columna, la fase móvil y los métodos de detección, se logra la migración diferencial de estos compuestos (Stith, 2000; Caboni y col., 2000 ; Yoon, 2002; Kang, 2002; Sala Vila, 2003; Descalzo, 2003; Manoj y col., 2002).

A pesar de que los analistas de lípidos fueron relativamente lentos para adaptarse a la separación de estos compuestos por CLAR fundamentalmente por las limitaciones de detectores apropiados (Christie, 1992), en los últimos años ha sido evidente el auge y la tendencia del análisis de estos importantes compuestos por esta ventajosa tecnología, muestra de ello es el gran número de propuestas analíticas novedosas de separación y detección, incluso más universales (Edwards, 2000; Neron y col., 2003).

Cuando se revisan los sistemas analíticos por CLAR que se utilizan para los fosfolípidos los aspectos más críticos son los detectores y la transparencia de los solventes cuando se utiliza la espectrofotometría al UV pues la detección óptima es cercana a 205 nm y a esta longitud de onda es limitado el número de solventes que puede ser utilizado. Por esta razón, se ha demostrado que en estos momentos el detector universal para estos compuestos es el detector de masa mas conocido en el campo analítico como *light scattering o evaporative analyser*, debido a que tiene la ventaja de que la fase móvil después del paso por la columna pasa a través de una chimenea donde es evaporada y quedan sólo los compuestos separados que son detectados por el rayo de luz que posteriormente se refleja o refracta de forma específica para cada analito, teniendo la gran ventaja de que permite el uso de gran número de solventes como fases móviles, especialmente el cloroformo que es el mejor para esta separación y que no se puede emplear para la detección a bajas longitudes de onda en la región ultravioleta (Christie, 1992).

El método espectrofotométrico se emplea en la determinación de la concentración total de una mezcla de fosfolípidos, el cual, al igual que otros como la densitometría se han utilizado de forma cualitativa y cuantitativa como complemento de los métodos de separación. También ha sido empleada la espectrometría de masa como un método muy eficiente para la identificación (Mayuko, 2001; y Murphy, 2002).

El uso de ensayos cromatográficos de forma combinada o independiente, constituyen la selección por excelencia de la mayoría de los laboratorios, debido a las ventajas que presentan; aunque en los últimos años se han ido desarrollando nuevas metodologías que se utilizaban sólo para el análisis de otros compuestos como proteínas y polisacáridos, y que se han incorporado al arsenal analítico de los fosfolípidos.

Ingvarsen y col. en 1994, fueron los primeros autores que publicaron el análisis de fosfolípidos en membranas biológicas y aceite de soya, por electroforesis capilar (EC): permitiendo la separación eficiente de una mezcla estándar que contenía fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina, en un tiempo de análisis de 25 minutos. Años más tarde, Szuees y col. en 1996, utilizaron esta misma técnica para el análisis de fosfocolinas.

Para la determinación de fosfolípidos también se han utilizado métodos enzimáticos (Firlong y col., 1991), estos en comparación con los de CCD y CLAR no requieren que las muestras sean extraídas con solventes orgánicos y hay menor posibilidad de tener pérdidas significativas de muestras, además de facilitar un análisis detallado de un gran número de ellas. Encinar y col. (1996) reportaron la determinación enzimática de fosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidilglicerol en membranas de células de sangre y en el surfactante pulmonar de ratas. La principal desventaja de estos ensayos es que solamente un lípido puede ser medido de una u otra muestra al mismo tiempo. Otra desventaja es que las muestras deben ser concentradas primero para lograr una adecuada sensibilidad en la medición. Por otra parte, algunos de estos ensayos requieren un peso exacto de pequeñas cantidades de enzimas para asegurar mediciones consistentes. Algunas de estas fuentes de errores pueden ser eliminadas mediante el uso de juegos de reactivos preparados comercialmente (Encinar y col., 1996).

A pesar de que desde hace muchos años se han desarrollado métodos analíticos de avanzada (CLAR y EC), para la separación y cuantificación de fosfolípidos, estos no son aún ampliamente utilizados en el control de calidad de medicamentos que tienen esta composición. Desde 1989 los laboratorios Abbot publicaron un nuevo sistema de análisis de los principios activos (fosfatidilcolina y su fracción disaturada) de un surfactante pulmonar (Scarim y col., 1989); en el año 1999 fue publicado un nuevo sistema analítico práctico y de bajo costo por EC para el control de calidad de un medicamento inyectable que contiene fosfolípidos de cerebro bovino, el cual permitía la separación de la PE, PC, PS y el PI, con indicadores de validación adecuados para estos fines (Lucangioli y col., 1999). Un año más tarde fue reportado un nuevo MA para el control de calidad y el seguimiento de la estabilidad de surfactante pulmonar porcino aprobado por la FDA para ser usado en el tratamiento del Síndrome de Dificultad Respiratoria, que permite la separación y cuantificación del principal principio activo (DPPC) y uno de los productos de degradación (ácido palmítico). El sistema consiste en columna Fase Reversa C8 con Fase móvil de acetonitrilo/ metanol/ ácido acético (50:45:10), y detección mediante índice de refracción, se utilizó el Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) como estándar interno.

Tanto los métodos alternativos y complementarios, como los más novedosos, requieren la demostración de la confiabilidad de sus resultados, aspecto que se logra, solo, mediante la validación, el establecimiento de los controles internos, y la minimización de la influencia de todos los factores que pueden ser fuente potencial de errores, aspecto que se alcanza mediante el control interno de la calidad en los laboratorios de ensayos.

### **1.5- Gestión de calidad en los laboratorios de ensayos**

En la industria farmacéutica actual está demostrado que para lograr producciones consistentes se requiere desarrollar un Sistema de Gestión de Calidad (GC) que integre de forma adecuada las BPP con el resto de las acciones asociadas al Aseguramiento y el Control de la Calidad (Regulación 16, 2000; ISO 9000, 2000).

El Control de Calidad (CC) como elemento clave componente de la GC abarca todas las técnicas y actividades de carácter operativo usadas para satisfacer los requisitos de calidad y contempla aspectos fundamentales como el muestreo, especificaciones y ensayos, entre otras funciones. La referencia cubana para la producción de medicamentos define tres requisitos básicos elementales del CC que son: la tenencia de instalaciones adecuadas, el uso de procedimientos aprobados y contar con personal capacitado (Regulación 16, 2000).

Los laboratorios de control de calidad de medicamentos son el conjunto de instalaciones, equipos, procedimientos y recursos humanos destinados a la comprobación y evaluación de la calidad de los medicamentos, por lo que para garantizar la seguridad y confianza necesarias estos laboratorios deben implantar modelos que aseguren su competencia para la evaluación de los medicamentos por lo que deben incorporar todos los requisitos técnicos y de gestión recomendados en la ISO 17025, así como las recomendaciones de las Guías de Buenas Prácticas de Laboratorio vigentes (NC ISO/ IEC 17025, 2000; Regulación 37, 2004).

Dentro de los requisitos técnicos abordados, los métodos de calibración y ensayo con los procesos de validación; la trazabilidad de las mediciones; así como el aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos y las calibraciones, constituyen acápites desarrollados en esta importante norma (NC- ISO/ IEC 17025, 2000).

#### **1.5.1- Control interno de la calidad en los laboratorios de ensayos analíticos**

Históricamente, los primeros métodos de control de la calidad se basaron en el juicio o inspección (Hinckley, 1997); esta forma de control tuvo serias limitaciones ya que los errores se detectaban cuando no tenían solución. Surge entonces, para superar esta limitación, la inspección de desafío, que constituyó una variante mejorada de la anterior, en la cual el control del producto final generaba datos que se utilizaban para mejorar el proceso, además, de decidir si se aceptaba, se rechazaba o se reprocesaba este producto. La implementación de esta forma de control de la calidad tuvo gran aceptación a nivel mundial, lo que jugó un papel fundamental en el desarrollo de la producción a gran escala.

Con la incorporación de la estadística al control de la calidad por Walter Shewhart se mejoró la eficacia en la evaluación de los productos. Actualmente, los gráficos de control más

comúnmente utilizados son los propuestos por él en los laboratorios Bell en 1924. El análisis estadístico utilizando gráficos de control permite detectar tendencias de los resultados que pueden afectar la exactitud cuando se obtienen valores repetidos por encima o por debajo de la media del gráfico, o detectar deterioro de la precisión cuando se observa un aumento de la variabilidad de los resultados. Estos gráficos de control estadísticos son una simple pero poderosa herramienta para el monitoreo de la estabilidad de un procedimiento analítico. Consisten en un material estándar que es medido regularmente y las respuestas analíticas son ploteadas en el tiempo sobre un diagrama o gráfico. La utilidad de estos gráficos se evidencia al permitirle al analista seguir la tendencia de los resultados y tomar medidas en caso de ser necesarias (Ohman, 1997).

Los controles internos son aquellos que se utilizan primariamente dentro de un laboratorio para garantizar la veracidad de un resultado, estos dependen del tipo de ensayo (Ohman, 1997). Para establecerlos es necesario contar con todas las medidas organizativas y de aseguramiento de la calidad que plantean las Buena Prácticas, tener todas las técnicas validadas, y es muy importante contar con muestras controles y/o materiales de referencia, donde una buena caracterización de estos, juega un papel importante en su utilización, y su uso permite demostrar que el método analítico ofrece estabilidad en los resultados obtenidos.

Durante la ejecución de un análisis, existe un gran número de fenómenos que pueden causar errores, desde la toma de la muestra hasta la realización de los cálculos para emitir un resultado; Ohman (1997) nombró a la prevención de estos errores como el Aseguramiento de la Calidad (AC), y definió el Control de la Calidad (CC), como la prevención cuando estos errores se enfocan sobre técnicas analíticas. Sin embargo, a pesar de ser esta una de las funciones principales del AC y el CC, respectivamente, coincidimos con los criterios de la ISO 3534-2 (1993), la cual expresa que el CC son el conjunto de técnicas operacionales y actividades que son usados para el cumplimiento de los requisitos para la calidad, el cual se considera que forma parte del AC, y que emplea técnicas estadísticas, gráficos de control, materiales de referencia, ensayos de aptitud y otros (Bode, 1996; Ohman, 1997).

Según Ohman (1997), cada sistema de control (interno y externo) de la calidad tiene ventajas y desventajas. El control interno es relativamente más barato, y puede ser usado frecuentemente en series analíticas, mientras que los controles externos son importantes para asegurar la consistencia de los resultados entre diferentes laboratorios. Nosotros compartimos el criterio de que ambos controles son imprescindibles para alcanzar la máxima seguridad de los resultados analíticos, sobre todo de ensayos que se utilicen en el

CC de productos que serán liberados o rechazados en dependencia de dichos resultados.

Hace unos años, miembro del Grupo A de trabajo del External Quality Assessment (EQA) de Europa, se reunieron para establecer las guías para el control interno de la calidad de los resultados analíticos en los laboratorios médicos (Hyltoft y Licos, 1996), y analizaron entre otros temas, los factores involucrados en la calidad analítica, así como los errores provocados por cada uno de estos factores, además de armonizar aspectos de la calidad de los ensayos, con relación al control interno de la calidad analítica, para unificar las reglas y proporcionar una guía que facilite el uso óptimo de los sistemas de control interno (Hyltoft y Licos, 1996).

Este autor, unos años antes, había citado tres elementos principales involucrados en la calidad analítica: las *especificaciones de la calidad analítica*, la *creación de la calidad analítica*, y el *control de la calidad analítica*; los cuales están interrelacionados (Hyltoft, 1994).

Las *especificaciones de la calidad analítica* son necesarias para conocer qué se entiende por calidad analítica, ya que todos los ensayos no requieren de la misma calidad; esta va a depender del propósito y del fin para el cual se destina dicho ensayo. La *creación de la calidad analítica*, está basada tanto en factores internos como externos, (Libeer, 1993; Hyltoft, 1993 y Libeer, 1996).

Siguiendo la interrelación establecida por Hyltoft (1994), el *control de la calidad analítica* está complementado por el control interno y la evaluación externa de la calidad de los ensayos.

Hace unos años la Confederación de la Comunidad Europea de Química Clínica (ECH), publicó los criterios esenciales para Sistemas de Calidad de laboratorios médicos, evaluado por el grupo de trabajo sobre Armonización de Sistemas de Calidad y Acreditación, donde las referencias aplicables están dadas por un número de documentos importantes tales como las series de la familia ISO 9000, la EN 45000 (Jansen y col., 1998), que son las normas más empleadas actualmente para la implantación de Sistemas de Calidad en laboratorios de ensayos, garantizando con su adecuada implantación la calidad analítica requerida y la credibilidad de los laboratorios.

#### **1.5.2- Validación de métodos analíticos**

El análisis farmacéutico es un campo donde frecuentemente se requieren nuevas aplicaciones analíticas debido al progreso tecnológico de la instrumentación, y a la necesidad de tener un mejor conocimiento de la calidad de los productos y sistemas de fabricación. Es por ello que todo analista debe conocer que los métodos analíticos usados

en el laboratorio deben validarse, cumpliendo de esta forma con las regulaciones actuales de las Buenas Prácticas de Laboratorio y de Manufactura (Regulación 16, 2000; Regulación 37, 2004; NC ISO IEC 17025, 2000).

Existen numerosas definiciones de validación analítica, así ha sido definida como un proceso mediante el cual se demuestra la aplicabilidad de un método analítico (Bamio y Artalejo, 1992), y consiste en el establecimiento de una evidencia documentada que demuestre con alto grado de probabilidad, que el método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos (Alvarez, 1996; Gil, 1995; Françoise y Petit, 1996). En esencia todas estas definiciones coinciden con el contenido explícito en la definición de que la validación de un método analítico es el proceso de verificación de que este es apropiado para el propósito previsto (Eurachem Guide, 1998).

De acuerdo a la variedad de ensayos analíticos existentes, se hace necesario establecer categorías que faciliten el estudio y reconozcan el tipo de información que se requiere para la validación de un método analítico, según la clasificación de la USP XXIV (2000), estos métodos se dividen en tres categorías:

Categoría I: métodos analíticos para la cuantificación de los principales componentes del fármaco, o de principios activos (incluyendo los preservos) en productos farmacéuticos terminados.

Categoría II: métodos analíticos para la determinación de impurezas o productos de degradación en el producto farmacéutico terminado, incluyendo ensayos cuantitativos y pruebas de límites.

Categoría III: métodos analíticos para evaluar las características físicas de las formas farmacéuticas terminadas, tales como disolución o liberación de fármacos (USP XXIV, 2000).

Para realizar una validación efectiva se necesita tener en cuenta una serie de parámetros importantes para llegar a conclusiones significativas sobre el comportamiento del método. Dentro de estos tenemos: precisión, exactitud, linealidad, rango o intervalo, límite de detección, límite de cuantificación, especificidad, tolerancia o fortaleza y robustez (Benítez, 1997 y Fernández, 1996). Los parámetros a considerar varían según las exigencias legales de diferentes organizaciones y fundamentalmente del método analítico seleccionado y el uso para el cual está previsto (Fernández, 1996 y Gil, 1995). Por tanto en dependencia de la categoría del ensayo, los requisitos de validación necesarios son: Categoría I: Precisión, exactitud, especificidad, rango, linealidad y tolerancia. Categoría II: Precisión, exactitud,

especificidad, rango, linealidad, tolerancia y límite de cuantificación. Categoría III: Precisión y tolerancia (USP XXIV, 2000).

#### **1.5.2.1- Requisitos de validación**

La *Linealidad* de un método analítico es la capacidad de este para asegurar que los resultados analíticos obtenidos directamente o mediante una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo definido (Gil, 1995; González, 1996).

Este parámetro se expresa mediante la construcción de una curva de calibración que debe cumplir con los siguientes requisitos: El coeficiente de variación de los factores respuestas no debe ser mayor del 5%, para considerar buena linealidad; la pendiente y varianza de la pendiente, a mayor pendiente mayor sensibilidad tendrá el método para diferenciar dos concentraciones cercanas, se prefiere que el coeficiente de variación de la pendiente sea menor de 2 %; se calcula por último el límite de confianza de la pendiente como intervalo, en el que deben estar las sucesivas rectas de calibración (Nuñez y col., 1996); el coeficiente de correlación debe ser igual o mayor de 0.99, mientras que la potencia de correlación,  $r^2$  mayor o igual a 0.98.

El *intervalo de concentraciones de analito* es aquel comprendido entre las concentraciones más alta y más baja, ambas incluidas, en el cual se ha demostrado que el método es lineal y funciona con precisión, exactitud y linealidad satisfactorias entre dichos valores de concentración (Bamio y Artalejo, 1992). Otro término relacionado con la linealidad es la *sensibilidad de calibrado* que no es más que el valor que adopta la pendiente de la recta de calibrado para el caso de calibración lineal simple (Bamio y Artalejo, 1992).

La *precisión* de un método es el grado de concordancia de los datos obtenidos para una muestra procesada varias veces, la que está limitada por errores aleatorios como los errores instrumentales, individuales, entre otros (ISO 5725-2 y 6, 1994). Este parámetro se puede expresar mediante el coeficiente de variación o desviación estándar relativa, cuyo valor aceptado para métodos cromatográficos y espectrofotométricos debe ser inferior o igual al 2 y 3 % respectivamente, en condiciones de repetibilidad, duplicándose, en dependencia de la variabilidad del ensayo, bajo condiciones de reproducibilidad (Fernández, 1996; González, 1996), para lo cual se analizarán un número de alícuotas suficientes para calcular estos estimadores estadísticos (Miller y Miller, 1984).

Un indicador muy utilizado, sugerido por la ISO 5725-3 (1994), para evaluar la precisión en cualquier condición de variabilidad es el llamado rango crítico (CR), que permite conocer la máxima variación permisible entre réplicas de una misma muestra en el método analítico.

El cálculo de la desviación estándar de repetibilidad ( $S_r$ ), es una evidencia de la variabilidad mínima del método, ya que se realiza en condiciones óptimas, mientras que la desviación estándar en condiciones intermedias ( $S_i$ ) expresa, en dependencia de la robustez del método una variabilidad mayor o menor de los resultados de este; existen métodos de ensayos en los que el valor de las  $S_i$  duplican o triplican el valor de la  $S_r$ , corroborando que la variabilidad de los resultados se incrementa al introducirse cambios en las condiciones de trabajo (ISO 5725-3, 1994).

La *robustez* (solidez) de un método se refiere a la reproducibilidad de este bajo condiciones diferentes. Estudia la influencia de pequeñas variaciones en las condiciones de trabajo introducidas intencionalmente y se observa la influencia de cada una de estas variaciones (Pasteelnik, 1993). Esta puede ser determinada experimentalmente, para conocer el efecto de cambios ambientales sobre el método, usualmente a través de enfoques factoriales (test de Youden). Se evalúa a través de un proceso de validación cruzada en el cual las nuevas condiciones son aplicadas y los datos son evaluados para determinar el efecto producido sobre los resultados en las nuevas condiciones (Youden y Steiner, 1975).

Un *factor crítico* es una variable cualitativa o cuantitativa donde una modificación de su valor puede inducir un cambio en el sistema respuesta.

El rango de variación aceptable para cada factor está determinado por las condiciones anticipadas de operación en los diferentes laboratorios. Las desviaciones de las condiciones normales de operación deben ser pequeñas, con vistas a trabajar, siempre, cercana a las condiciones óptimas de operación (Virlichie y Ayade, 1995).

La *exactitud* de un método analítico es la cercanía de los resultados de prueba obtenidos con el valor verdadero (ISO 5725-1, 1991; Gil, 1995 y González, 1996). La ISO 5725-2,6 (1994) define el término *exactitud* como la estrecha relación que existe entre la media aritmética obtenida de varios resultados analíticos en el procedimiento en estudio y el valor real o valor de referencia aceptado; la cual está influenciada por errores sistemáticos como: la utilización de equipos de medición no adecuados, una calidad de reactivos incorrecta, no utilizar el método analítico apropiado, etc.

Por tanto, un procedimiento es exacto si sobre el promedio o media de los resultados del método, proporciona la respuesta verdadera (ISO 5725-3, 1994). La exactitud se puede evaluar: comparando el método analizado con uno de referencia; utilizando materiales de referencia de valores conocidos; realizando estudios de recobrado, etc. Es bueno señalar que no siempre se dispone de un método de referencia o mejor, definitivo para comprobar la exactitud del utilizado por el laboratorio para trabajos de rutina. Por otra parte, poseer

materiales de referencias resulta caro y frecuentemente no se producen por las casas comerciales, por lo que muchos laboratorios utilizan los estudios de recobrado como un indicador de la exactitud de estos métodos. Este parámetro se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de muestras, a las que se les han adicionado cantidades conocidas de un estándar puro del analito (González, 1996).

La técnica del estándar interno es muy común en metodología bioanalítica especialmente con procedimientos cromatográficos (Shaikh, 1995). El criterio para seleccionar un estándar interno adecuado es que las características de partición del analito y el estándar interno sean muy similares. Esto puede ser una asunción falsa, y en correspondencia con Curry y Whelpton, el único uso apropiado de los estándares internos análogos es servir como marcadores cualitativos, para detectar o monitorear estabilidad y para corregir errores de dilución y pipeteo (Curry y Whelpton, 1978).

Los términos *selectividad* y *especificidad* son muchas veces usados indistintamente, no obstante cabe distinguir que el término especificidad se refiere al método que produce una respuesta para un único analito y en el caso de la selectividad, se refiere a aquel método que produce una respuesta para un número de entidades químicas que pueden o no ser distinguibles (Eurachem Guide, 1998).

Existe una gran variedad de vías para evaluar la selectividad de un método analítico. La más simple es demostrar la falta de respuesta en una matriz biológica blanco. Otra vía es demostrar que el intercepto de la curva de calibración es significativamente diferente de cero. Esta prueba puede ser muy flexible o rígida en dependencia de la reproducibilidad de la calibración (Eurachem Guide, 1998).

La presencia del efecto matriz puede ser verificada mediante comparación de pendientes entre una matriz con un estándar del analito añadido, una matriz sin analito (placebo), o por adición del estándar (Florence y Veuthey, 1996). Esta última consiste, en la adición de cantidades conocidas de analito a una muestra real la cual puede contener otros metabolitos. Esta técnica puede ser útil para demostrar la ausencia del efecto matriz con respecto a metabolitos cuando no hay disponibilidad de estándar primario de estos metabolitos.

La *tolerancia* es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos por el analista de la misma muestra bajo diferentes condiciones de operación como laboratorio, lotes de reactivos críticos, equipos, entre otros. Se puede comprobar mediante estudios interlaboratorios (Bamio y Artalejo, 1992).

El *límite de detección* es la menor concentración (o cantidad) de analito que se puede detectar con razonable certeza por un método analítico dado. Es un parámetro de gran importancia en los ensayos límites, análisis de trazas, y de productos de degradación del analito o contaminantes externos. Generalmente se expresa como concentración mínima de analito en la muestra (Pasteelnik, 1993; Caporal y col., 1990), aunque consideramos que la forma adecuada de expresarlo es en unidades de cantidad de sustancia (masa). Este parámetro puede determinarse mediante el estudio experimental de la menor cantidad detectable, se aplica en los casos de métodos cromatográficos en capa fina y permite la detección de impurezas o productos de degradación en materias primas. También el valor de la ordenada en el origen, expresada en términos de concentración, puede utilizarse, en general, para determinar el límite de detección siempre y cuando la recta de regresión haya sido construida con valores de concentraciones bajos.

Por otra parte, el *límite de cuantificación* es la menor concentración de analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas. Se expresa, al igual que el límite de detección como concentración de analito (Pasteelnik, 1993).

Ambos límites pueden determinarse mediante la relación señal/ ruido. Este procedimiento será de aplicación en el caso de métodos instrumentales. Otros autores señalan la variante de análisis repetidos con o sin corrección de lectura frente a un blanco en el caso de métodos espectroscópicos y cromatográficos, respectivamente (Taylor, 1987; Massart y col., 1988).

### **1.5.3- Materiales de referencia**

Un material de referencia (MR) es una sustancia en la cuál una o más de sus valores propios son suficientemente homogéneos y están bien establecidos para ser usados para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a materiales (NC- ISO Guía 30, 1998).

El Comité de Expertos de la OMS sobre especificaciones de preparaciones farmacéuticas, recomiendan guías generales para la producción, conservación y distribución de Materiales de Referencia Certificados (MRC), los cuales han sido clasificados, atendiendo a su composición, en Materiales de Referencia Químicos (MRQ) y Materiales de Referencia Biológicos (MRB), (Informes Técnicos, OMS, 1990). En Cuba desde el año 1998 se desarrolló una actualización de las referencias normativas de esta temática, regulándose de manera armonizada con las regulaciones internacionales, todo lo referente al uso de los materiales de referencia para la calibración en química- analítica (NC- ISO Guía 32, 2000);

el uso de los Materiales de Referencia Certificados (NC- ISO Guía 33, 2000); todos los lineamientos del Sistema de Calidad para la producción de Materiales de Referencia (NC- ISO Guía 34, 1998); así como el proceso de Certificación de los MR (NC- ISO Guía 35, 1998) y el contenido de los certificados de estos MR (NC- ISO Guía 31, 1998).

El NIBSC (Instituto Nacional para Standard Biológico y Control) ha creado MRB cuyos usos más frecuentes son:

- Definir la potencia de productos terapéuticos, expresados en unidades internacionales.
- Calibrar ensayos biológicos e inmunoensayos usados en investigaciones biológicas y médicas.

También esta institución prepara, evalúa y distribuye otra clase de MRB los cuáles tienen un papel esencial en la validación de métodos analíticos (Phillips y Robertson, 1997).

Los Materiales de Referencia pueden ser certificados (MRC), por organizaciones internacionales reconocidas (NIST, OMS, NIBSC, etc.) (NC-ISO Guía 33, 2000; Walker, 1997), para ello los valores de una o más propiedades son certificadas por un procedimiento técnicamente validado acompañado por un certificado de trazabilidad u otra documentación que sea emitida por dichas organizaciones. Estos materiales se caracterizan por su elevada pureza o pureza certificada, y son muy útiles cuando se realizan controles o calibraciones exactas; en la verificación de la calibración; para el mejoramiento de la calidad de las mediciones; verificación de la exactitud de los resultados; control de la calidad diaria mediante gráficos o mapas controles; etc. (Griepink, 1990). La OMS se destaca dentro de las organizaciones antes mencionadas, por la aprobación de un número importante de MRC para una gran gama de sustancias químicas, bioquímicas, entre otras. No obstante, existen muchas otras sustancias que aún no tienen estos materiales de control.

El papel de los MRC ha sido objeto de otras publicaciones, que coinciden en señalarlos como imprescindibles tanto en el control interno de la calidad (estadístico), como en las verificaciones externas (Hyltoft y Licós, 1996; Lipinski, 1997).

Muchas son las regiones que hacen grandes esfuerzos para utilizar los materiales de referencia certificados (MRC) por ejemplo en Europa por más de veinte años, a través de sucesivos programas científicos la Comisión Europea ha apoyado la mejoría de las mediciones físicas, químicas y biológicas por medio de MRC (Mériguet y Maier, 1997). En Japón el Instituto Nacional de estudios Medio Ambientales (NIBS), ha desarrollado varios MRC para determinar trazas de metales (Agrawal y col., 1997). También Malasia, Indonesia, Filipinas utilizan MRC farmacéuticos. En América Latina países como Chile, Brasil, tienen proyectos para producir estos materiales (Lipinski, 1997). En Cuba el Instituto C. J. Finlay, el

Centro de Inmunología Molecular, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología hacen esfuerzos para lograr materiales de referencia certificados nacionalmente.

Sin embargo, la tenencia de MRC ofrece dificultades, incluso en países desarrollados, debido al elevado costo para adquirirlos, además, la diversidad de productos y ensayos no permite la existencia de un gran número de MRC; es por ello que la mayoría de los laboratorios encargados de evaluar productos elaboran sus propios materiales de referencia para uso interno en el control de la calidad, denominados Materiales de Referencia Internos (MRI) (NC- ISO Guía 32, 2000). La forma de caracterizar estos materiales puede ser a través de mediciones usando: un método único definitivo, dos o más métodos de referencia independientes por una organización, una red de organizaciones calificadas que emplean métodos de exactitud demostrada o una propuesta de método específico (estudio interlaboratorios) que brinda sólo valores propios al método específico evaluado (NC- ISO Guía 34, 1998). En todos los casos, si existe un MRC debe realizarse pruebas de contrastación entre el material interno y el certificado (Iyengar y Wolf, 1997). La preparación de los MRI deberá realizarse por un procedimiento que garantice indicadores imprescindibles como la disponibilidad, la homogeneidad, y la estabilidad (NC-ISO Guía 32, 2000); además, deben ser reproducibles y tener una composición similar a la de las muestras y similar matriz (Hyltoft y Licós, 1996).

En las últimas regulaciones de Buenas Prácticas de Laboratorio de varios países, recomiendan un manejo adecuado de estos materiales, tan importantes para asegurar la calidad analítica de los ensayos, específicamente, lo relacionado con el uso, preparación, conservación y distribución (Regulación 37, 2004).

En nuestro país la elaboración de un material de referencia requiere el cumplimiento de los requisitos planteados en las normas cubanas que regulan esta actividad, lo que demanda un gran esfuerzo del laboratorio productor para cumplir los ensayos requeridos para la validez del material de referencia. Sin embargo, la confianza que brinda el material de referencia al resultado del ensayo, permite disminuir el número de repruebas y tomar decisiones de aceptar o rechazar con mayor confianza, esto se traduce, finalmente, en una reducción de los costos de calidad del producto, disminución de las quejas y reclamaciones por no cumplimiento de los requerimientos de calidad. Son estas las razones que han impulsado en la actualidad a gran número de laboratorios a elaborar sus propios materiales que son imprescindibles para el control de la calidad de los productos.



# ***CAPITULO 2***

## 2. MATERIALES Y METODOS

Los reactivos empleados en la realización de este estudio fueron de firmas reconocidas y de la calidad requerida. Se utilizaron el hidróxido de amonio, el ácido amino 2- naftol- 4- sulfónico, la acetona y el cloroformo (Fluka); el ácido linoleico y la albúmina sérica bovina (BDH); solución salina 0.9% (IMEFA), cromatoplasmas silica gel (20x20) sin fluoresceína (0.25 mm de espesor), cromatoplasmas silica gel (20x20) sin fluoresceína (0.25 mm de espesor, con zona concentradora), yodo sublimado, ácido perclórico, alúmina neutra (100-200  $\mu$ ), bisulfito de sodio, metanol, sulfito de sodio, tetraóxido de osmio, tetracloruro de carbono, etanol, trietilamina, acetonitrilo (Uvasol®), ácido fosfórico (85 %), todos de la Merck; el fosfato monobásico de potasio (Reachim); molibdato de amonio (Siech), nitrógeno gaseoso; juego de patrones de fosfolípidos (SIGMA) con la siguiente composición: esfingomielina (SM), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), y mezcla de fosfolípidos para HPLC (SUPELCO).

Los equipos de medición empleados fueron calibrados y declarados aptos para el uso por la institución nacional correspondiente: balanza analítica (Mettler H35 AR), balanza digital (Sartorius Portable), espectrofotómetro (Ultrospec Plus farmacia LKB), espectrofotómetro (Lasso Biotech LTDA), y HPLC KNAUER. El resto de los equipos están declarados aptos para el uso: centrífuga refrigerada (Jouan KR 4-22), centrífuga de flujo continuo Alfa- Laval, batidora (LKB), plancha de calentamiento con arena, homogenizadores mecánicos, baño termostático (Buchi), estufa (modelo 101-1), agitador de tubos (VF-2), rotoevaporador (ILK), liofilizadora (EDWARDS EF 0.3), balón de nitrógeno. La cristalería de medición exacta utilizada fue declarada apta para el uso y las pipetas automáticas estuvieron debidamente calibradas.

Para la caracterización de los Materiales de Referencia Internos se utilizaron los métodos de cuantificación espectrofotométrica de fosfolípidos totales (Zilversmith, 1950), de separación y cuantificación de fosfolípidos disaturados por cromatografía de columna convencional (Mason y col., 1976); y el método de separación y cuantificación por Cromatografía de Capa Delgada de cada fosfolípido específicamente la LPC y PC (Touchstone y col., 1980).

**2.1- Validación de los métodos analíticos**  
**2.1.1- Cuantificación de fosfolípidos totales**

**2.1.1.1- Operaciones preliminares**

Preparación de la curva de calibración: Se emplearon soluciones de 0,20; 0,10 y 0,05 mg/ mL de fósforo, las cuales se prepararon a partir de la solución madre (0,20 mg/ mL de fosfato monobásico de potasio como fuente de fósforo), mediante diluciones seriadas.

Preparación de las muestras: Las muestras (50 mg de fosfolípidos) fueron disueltas en cloroformo para una concentración de 5 mg/ mL.

**2.1.1.2- Marcha analítica**

- Se tomó por triplicado volúmenes de la muestra patrón o blanco y se colocaron en tubos pyrex.
- Se añadió 0,5 mL de ácido perclórico 60-70%.
- Se realizó la digestión en un baño de arena (200- 300 °C) durante 45 minutos.
- Enfriamiento a temperatura ambiente.
- Se añadió 3 mL de agua destilada; 0,5 mL de molibdato de amonio y se agitó con ayuda de un vortex.
- Se añadió 0,5 mL de reactivo color (ZilverSmith, 1950), previamente diluido, y se agitó en un vortex. Se dejó en reposo durante 20 minutos.
- Se leyó contra blanco reactivo a longitud de onda de 660 nm en un espectrofotómetro.

**2.1.1.3- Metodología de la validación**

Teniendo en cuenta que este ensayo pertenece a la categoría I, según la clasificación realizada por la USP XXIV, se tuvo presente la demostración de los siguientes parámetros: exactitud, linealidad, precisión y selectividad (USP XXIV, 2000).

Para la comprobación de la **linealidad** se procedió a realizar una curva de calibración, para lo cual se empleó un patrón de fósforo, se obtuvieron cinco niveles de concentración en un rango de 30-120 % del valor esperado. En este caso se preparó una solución madre de 0,26 mg/ mL de fósforo, a partir de la cual se prepararon los restantes puntos de la curva. Se realizaron cinco repeticiones por cada nivel de concentración teniendo en cuenta la marcha analítica descrita.

Se realizó un estudio de regresión lineal, mediante el Sistema Excel, se determinó la recta de mejor ajuste, los coeficientes de correlación (r) y de determinación ( $r^2$ ), así como la pendiente y el intercepto, tomando como criterios de una adecuada linealidad cuando  $r > 0,99$ ;  $r^2 > 0,98$ ; y que la pendiente y el intercepto no difiera de 1 y 0 respectivamente.

La **exactitud** se demostró a través de una curva de recuperación. Se utilizó agua desionizada para disolver las muestras, en sustitución del procedimiento normal de disolver en cloroformo, para obtener condiciones similares a los patrones, evitando así la formación de dos capas que afectaría la preparación de los diferentes niveles de concentraciones necesarios.

Para la preparación de la muestra real se realizó un pool con cinco frascos del mismo lote de producto, y se disolvió el contenido en un volumétrico de 50 mL, con agua desionizada (5 mg/mL). Para la preparación de las porciones de ensayo, se tomaron 0,1 mL de muestra real y se le añadieron diferentes volúmenes de patrón (0,20 mg/mL de fósforo), completando con agua desionizada, hasta un volumen final de 2,1 mL.

Se realizó una curva de recuperación con los diferentes niveles anteriormente mencionados, realizando seis repeticiones por cada nivel. Se determinaron las concentraciones observadas según la marcha analítica descrita anteriormente; y las concentraciones esperadas y los porcentajes de recuperación se calcularon aplicando las ecuaciones (I) y

(II).

$$(I) \text{ Concentración esperada} = \frac{\text{Masa de la muestra real} + \text{Masa de patrón añadida}}{\text{Volumen de la muestra} + \text{Volumen añadido}}$$

$$(II) \% \text{ recuperado} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} * 100$$

Se analizó estadísticamente, mediante el Sistema Excel, la relación entre las concentraciones observadas y esperadas, y se determinó el coeficiente de correlación (r) que debe mostrar valores superiores a 0,99 como indicativo de una adecuada exactitud.

Para analizar la precisión del método se llevó a cabo ensayos de **repetibilidad** y **precisión en condiciones intermedias**.

Se demostró la **repetibilidad** tomando cuatro bulbos de un mismo lote de producto, a los cuales se les adicionaron diferentes volúmenes de cloroformo de forma tal que se obtuvieron cuatro niveles de concentraciones de fosfolípidos (mg/mL). Se realizaron siete repeticiones

por cada nivel de concentración siguiendo la marcha descrita bajo condiciones óptimas (analista, día, equipo, y lote de reactivos idénticos).

Se calculó la desviación estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) y el intervalo crítico (CR), mediante las ecuaciones (III) y (IV), (ISO 5725-3, 1994).

$$(III) S_r = \sqrt{\frac{1}{t * (n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (Y_{jk} - \bar{Y})^2}$$

donde:

$t$ : número de niveles

$n$ : repeticiones por cada nivel

$Y_{jk}$ : resultado de la prueba para cada réplica

$$(IV) CR(n) = f(n) * S_r$$

donde:

$f(n)$ : factor tabulado de intervalo crítico para una  $n$  determinada [para  $n=3$ ,  $f(n)= 3,3$ ]

$n$ : número de replicas en cada determinación

Para el ensayo de *precisión en condiciones intermedias* se trabajó con los mismos niveles de concentración que en ensayo de repetibilidad.

En este punto se evaluó la influencia de diversas variables en el resultado final del ensayo; teniendo en cuenta diferentes situaciones tales como: operador (O), tiempo (T), lote de reactivo color (R) y equipo (E), así como algunas interacciones entre estas variables, lo que permitió calcular la desviación estándar de precisión en condiciones intermedias ( $S_i$ ), para cada una de estas situaciones.

Situaciones evaluadas según necesidades prácticas:

- Un analista, dos días diferentes con lotes de reactivos idénticos  $S_i$  (T).
- Dos analistas, un mismo día  $S_i$  (O).
- Un analista, dos días diferentes, con lotes de reactivos diferentes  $S_i$  (T, R).
- Dos analistas, dos días diferentes, con lotes de reactivos idénticos  $S_i$  (O, T).
- Un analista, dos días diferentes, con diferente equipo  $S_i$  (T, E).

Se realizaron siete repeticiones por cada nivel de concentración en cada situación evaluada, siguiendo el mismo procedimiento de análisis anterior.

Se calculó posteriormente la desviación estándar de la precisión en condiciones intermedias ( $S_i$ ), para cada una de las condiciones propuestas según (III), y se determinó el intervalo crítico (CR), mediante (IV). Se llevó a cabo, además, un análisis de varianza (ANOVA) para conocer cuál de estas variaciones es la que más influye en el resultado final.

Para evaluar la **selectividad** se emplearon dos frascos del mismo lote. Una de las muestras fue contaminada mediante la adición de 50ug de ácido linoleico y 0,0005g de albúmina sérica bovina (BSA), que simulan componentes minoritarios del producto, por presentar grupos químicamente activos similares a los de otros compuestos presentes en el producto, como proteínas y ácidos grasos fundamentalmente.

Se realizaron tres repeticiones para la muestra normal y para la muestra contaminada siguiendo el mismo procedimiento anterior. Posteriormente se compararon los resultados mediante un test no paramétrico para n pequeñas (Wilcoxon), permitiendo de esta forma comprobar si existen diferencias significativas entre ambas muestras.

### **2.1.2- Separación y cuantificación de fosfolípidos disaturados**

#### **2.1.2.1- Operaciones preliminares**

✍ Preparación de la solución de trabajo de tetraóxido de osmio (6,2 mg/mL), a partir de la solución madre (100 mg/mL), preparada en el momento de usarse, empleando tetracloruro de carbono como solvente, según la Ley de la volumetría.

✍ Preparación de las columnas cromatográficas:

Se emplearon columnas de 10 cm de largo y 0,5 cm de ancho con lana de vidrio en el cuello, empaquetadas con 1g de alúmina neutra anhidra. Las columnas se activaron colocándolas en una estufa a 110°C durante 6 horas como mínimo.

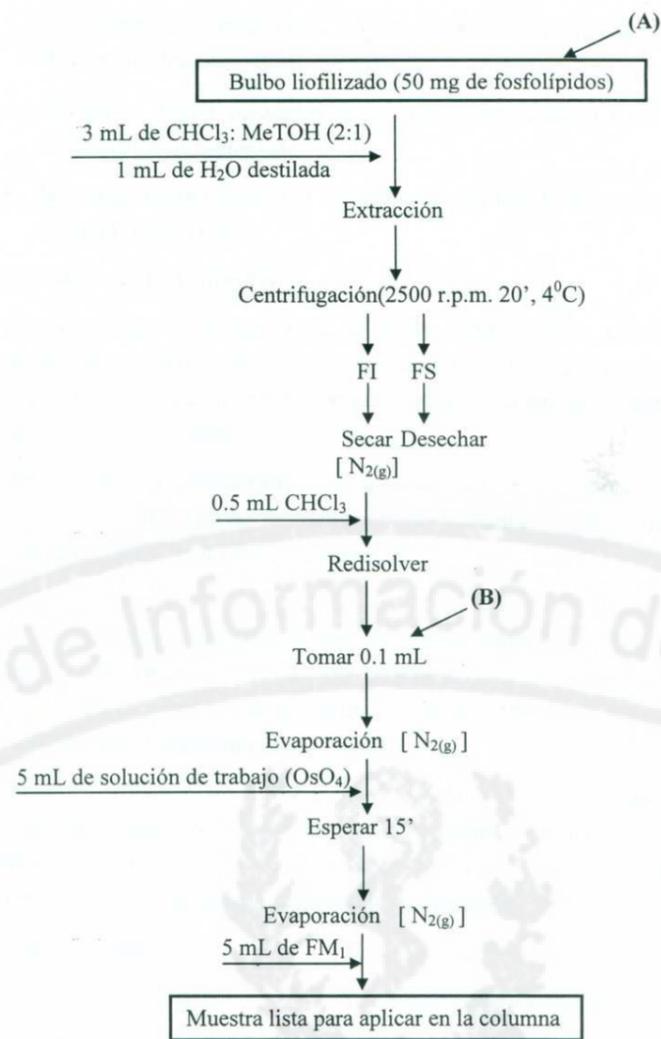
✍ Preparación de las fases móviles (FM):

FM<sub>1</sub>: Compuesta por mezcla de cloroformo - metanol (20:1).

FM<sub>2</sub>: Compuesta por mezcla de cloroformo - metanol - amoníaco (7M) (70:30:1).

#### **2.1.2.2- Marcha analítica**

- Se preparó la muestra según el diagrama en la Figura 1.
- De cada muestra se tomaron 0,5 mL, para aplicar en las columnas, tomando además 0,1 mL por duplicado en tubos Pyrex identificándolos como fosfolípidos totales (DO<sub>t</sub>).
- Una vez que la muestra fue aplicada a la columna, esta se eluyó con 10 mL de la FM<sub>1</sub>.
- Se colectó el eluyente como lípidos neutros en una probeta de 10 mL; se completó el volumen con la misma fase móvil y se tomaron 3 mL por duplicado en tubos Pyrex rotulados como DO<sub>1</sub>.



**Figura 1: Diagrama de la preparación de la muestra en el método de separación y cuantificación de fosfolípidos disaturados**

- Se eluyó nuevamente la columna, ahora con 10 mL de la FM<sub>2</sub>. Se colectó el eluyente como fosfatidilcolina disaturada en una probeta de 10 mL, se completó el volumen con la misma fase móvil 2 y se tomaron 3 mL por duplicado en tubos Pyrex rotulados como DO<sub>2</sub>.
- Los tubos fueron colocados en un baño termostático y se evaporaron las muestras hasta sequedad.
- Se realizó posteriormente la determinación de fosfolípidos totales por el método de Zilversmith (1950).

### 2.1.2.3- Metodología de validación

Este método también pertenece a la categoría I de métodos cuantitativos para la determinación de principios activos, según la clasificación realizada por la USP XXIV, por ello fue necesario la demostración de los parámetros de linealidad, exactitud, precisión y especificidad (USP XXIV, 2000).

Se realizaron, para la demostración de la **exactitud**, dos variantes de diseño, una correspondiente a la exactitud del proceso completo (Variante 1) y otra correspondiente a la exactitud de la corrida cromatográfica (Variante 2).

Para la variante 1, se partió de cuatro bulbos de surfactante pulmonar (50 mg de fosfolípidos) de un mismo lote, de los cuales tres bulbos fueron contaminados con diferentes volúmenes de una solución patrón de Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (100 mg/mL), se completaron con cloroformo hasta un volumen final de 0,125 mL, a los que se le realizó posteriormente el pre- tratamiento de las muestras (Figura 1).

Se ejecutó el procedimiento descrito en la marcha analítica para cada muestra, se realizaron dos corridas por cada una, se determinaron experimentalmente las concentraciones observadas y se obtuvieron las esperadas de una forma indirecta a través de la fórmula (I), parámetros a los que se les asignaron las siguientes variables:

$X_1$ : Masa de la muestra real

$X_3$ : Volumen total de la muestra

$X_2$ : Masa de patrón añadida

$X_4$ : Concentración esperada

Se calculó la  $X_2$ , aplicando posteriormente una regla de tres, donde la cantidad total añadida de DPPC a las muestras, corresponde al 100%, y el valor calculado ( $X_2$ ), representa el porcentaje que es capaz de recobrar el ensayo.

En la variante 2, para demostrar la exactitud de la separación cromatográfica, se utilizó un frasco de producto (50 mg de fosfolípidos) del mismo lote el cual fue sometido al pre-

tratamiento de la muestra hasta el punto (B), en que se le añadió 0,5 mL de cloroformo a la muestra previamente seca, a partir de aquí se tomaron varias alícuotas de 0,1 mL, a las cuales se les añadieron diferentes volúmenes de la solución patrón de DPPC (100 mg/mL), y se completaron con cloroformo hasta un volumen final de 0,125 mL.

Finalmente se realizó el mismo procedimiento anterior para cada muestra, con dos corridas para cada una, hasta obtener los resultados finales, se determinaron las concentraciones esperadas, y los porcentajes de recuperación mediante las ecuaciones (I) y (II).

En el análisis de la **precisión** se realizaron ensayos de **repetibilidad** y **precisión en condiciones intermedias**.

Para verificar la **repetibilidad** se partió de cuatro bulbos del mismo lote, a los cuales se les realizó el pre-tratamiento de la muestra hasta el punto de centrifugación y secado de la fase clorofórmica (B); a partir de aquí se le añadieron diferentes volúmenes de cloroformo para obtener cuatro niveles de concentración (un nivel bajo, dos niveles intermedios, un nivel alto). Posteriormente se continuó según el diagrama (Figura 1).

Se realizaron cuatro corridas por cada nivel de concentración siguiendo la marcha descrita, en condiciones óptimas (analista, día, equipo y lote de reactivo, idénticos).

Se calculó la desviación estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) según ecuación III y el intervalo crítico (CR) según la ecuación IV (ISO 5725-3, 1994).

Para el estudio de la **precisión en condiciones intermedias** del método, se utilizaron muestras del mismo lote, se trabajaron con los mismos niveles de concentración que en el ensayo anterior.

En este ensayo se tuvo en cuenta, solamente, la variable tiempo (T), puesto que este método se compone de tres etapas: 1-Preparación de la muestra, 2- Separación de la DPPC por una cromatografía en columna, 3- Detección y cuantificación espectrofotométrica a 660 nm. Por tanto como la tercera etapa de esta técnica fue validada en la primera parte del trabajo, la única situación que fue de interés analizar fue:

- Un analista, dos días diferentes (T).

Se realizaron cuatro corridas por nivel de concentración en la situación evaluada siguiendo la marcha analítica descrita; que permitirá evaluar la variabilidad de los resultados bajo condiciones de reprobación.

Se calculó posteriormente la desviación estándar ( $S_i$ ) según la ecuación (III), y se determinó el rango crítico (CR), mediante (IV). Se llevó a cabo además un análisis de varianza

(ANOVA) para conocer si existían diferencias significativas entre la situación evaluada y las condiciones óptimas de repetibilidad.

Para verificar la **especificidad** del método se partió de un frasco de producto, al cual se le realizó el procedimiento para la obtención de las muestras hasta el punto donde se disuelve el contenido de interés en 0,5 mL de cloroformo, posteriormente se tomaron alícuotas de 0,1 mL por duplicado; una de las muestras fue contaminada con 0,4 mg de albúmina sérica bovina (BSA), 0,05 mL de fosfatidilglicerol y 0,22 mL de fosfatidilinositol. Se realizaron dos corridas para cada muestra preparada siguiendo la marcha analítica descrita.

Posteriormente se compararon los resultados mediante un test no paramétrico para n pequeñas (Wilcoxon), permitiendo de esta forma comprobar si existían diferencias significativas entre ambas muestras analizadas.

### **2.1.3- Identificación y cuantificación de fosfolípidos por cromatografía en capa delgada (CCD)**

#### **2.1.3.1- Operaciones Preliminares:**

Preparación de las muestras: Los componentes de interés fueron extraídos con cloroformo-metanol- agua (2:1:1) con agitación. Posteriormente se centrifugó a 2500 rpm a 4°C, durante 20 minutos en una centrifuga refrigerada. Se desechó la fase superior (hidroalcohólica) y la inferior (clorofórmica) se llevó a sequedad, la que se redisolvió en cloroformo para lograr concentración de 100 mg/mL. La separación y cuantificación se realizó por la metodología propuesta por Bartleet en 1959.

#### **2.1.3.2- Metodología de validación**

Este ensayo se puede ubicar dentro de las categorías I y II según la clasificación de la USP XXIV, ya que el mismo permite la detección y cuantificación, no solo de los principales componentes del producto, dentro de los cuales está el componente mayoritario y principio activo (fosfatidilcolina), sino también el producto de degradación que se encuentra en pequeñas cantidades (lisofosfatidilcolina); por lo que se hace necesario la demostración de los parámetros de linealidad, precisión, límites de detección y cuantificación y la especificidad (USP XXIV, 2000).

Para la comprobación de la **linealidad** se procedió a realizar una curva de calibración formada por seis niveles de concentraciones que estuvieran en el rango 25-200 % del valor en que se mueven las muestras (Travieso, 1998). Se prepararon a partir de una solución madre de fosfato monobásico de potasio (0,2 mg/mL de fósforo) las restantes concentraciones de (0,10; 0,15; 0,25; 0,5; 2; y 5)  $10^2$  mg/mL, respectivamente, realizando

diez réplicas por cada punto. Se realizó un análisis de regresión utilizando el Sistema Excel para determinar la pendiente, el intercepto, coeficiente de correlación, así como la dependencia de la D.O respecto a la Concentración.

El análisis de la **precisión** se realizó mediante un estudio retrospectivo basado en datos históricos.

Para el estudio de la **repetibilidad** se diseñó el análisis independiente de tres placas cromatográficas, en las cuales se aplicaron tres muestras por duplicado ( $n=6$ ) de un lote homogéneo, contra dos columnas blanco; las mismas se realizaron en condiciones óptimas (analista, reactivos color y equipos). Posteriormente se realizó tratamiento estadístico mediante el uso del Software confeccionado según la norma ISO 5725-3,1994 (Amador y Miranda, 2000); que permitió el cálculo de la desviación estándar de repetibilidad ( $S_r$ ) y del rango crítico (CR).

Se comprobó la **precisión bajo condiciones intermedias** procesando datos obtenidos del análisis cuando varió el reactivo color y el día del análisis  $S_i$  (TR).

Para conocer los **límites de detección (LD)** y **cuantificación (LQ)** de la parte colorimétrica del método se preparó una curva de calibración de bajas concentraciones  $(0,10 - 5) \times 10^{-2}$  mg/ mL de fósforo; se utilizaron seis puntos de concentración realizando diez réplicas por cada punto incluyendo el blanco. Se realizó la técnica descrita y se siguió el criterio de  $LD = X_B + 3 DS_B$  y  $LQ = X_B + 10 DS_B$ , donde  $X_B$  es la media de los valores de D.O del blanco, y  $DS_B$  es la desviación estándar de esos valores; los cuales se obtuvieron en unidades de Absorbancia (A) y se extrapolaron en la curva de calibración que presentó comportamiento lineal, pudiéndose conocer la concentración, y con el volumen, tomado de cada nivel de concentración, para realizar el análisis se determinó el valor de estos límites expresados en unidades de masa (mg). Se efectuaron tres repeticiones de este estudio.

Se analizó el **límite de detección del método cromatográfico cualitativo**, para lo cual se analizaron cada uno de los componentes que se encuentran en pequeñas cantidades en el producto tales como la lisofosfatidilcolina (LPC) que es el producto de degradación que se encuentra en cantidades menores de un 2 %, entre otros componentes. Se utilizaron patrones comerciales puros (SIGMA) de cada uno de estos componentes: fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilglicerol (PG). El experimento consistió en aplicar en una placa cromatográfica (con microjeringa de 10 uL), cuatro concentraciones bajas conocidas de cada uno de estos patrones (Tabla 1), por duplicado, con el fin de conocer cuál es la mínima cantidad de estos analitos que se deben aplicar para que sean visualizados con el sistema de revelado utilizado. Como la evaluación es visual

(cualitativo) se realizó por dos analistas de experiencia en la identificación de este tipo de manchas (contraste leve: amarillo-blanco). El experimento se realizó tres veces para garantizar la reproducibilidad de este resultado.

**Tabla 1: Cantidades aplicadas de componentes minoritarios para determinar el LDC del método de CCD**

Patrón	Concentración (mg/ mL)	Volumen aplicado (ul)									
		Blanco	MRI	3	4	5	6	7	8	9	10
LPC	50	-	-	0,12	0,12	0,25	0,25	0,5	0,5	1,0	1,0
PS	10	-	-	0,6	0,6	0,8	0,8	1,0	1,0	1,2	1,2
PI	5	-	-	0,5	0,5	1,0	1,0	1,2	1,2	1,5	1,5
PE	10	-	-	0,6	0,6	0,8	0,8	1,0	1,0	1,2	1,2
PG	10	-	-	0,6	0,6	0,8	0,8	1,0	1,0	1,2	1,2

La **especificidad** del método se estudió mediante el análisis cualitativo, en una misma placa, de dos muestras normales y dos muestras contaminadas: con ácidos grasos (oleico y linoleico) y proteínas (por duplicado), con el objetivo de detectar la presencia de estos contaminantes en la corrida cromatográfica al compararlo con el perfil cromatográfico de las muestras normales, y en dependencia del resultado cualitativo se procedería o no a la cuantificación.

#### 2.1.4- Estandarización, optimización y validación de un método de análisis de fosfolípidos por CLAR

##### 2.1.4.1- Definición del Sistema preliminar.

- a) Preparación de las muestras: Los componentes de interés fueron extraídos con cloroformo- metanol- agua (2:1:1) con agitación. Posteriormente se centrifugó a 2500 r.p.m. a 4°C, durante 20 minutos en una centrifuga refrigerada. Se desechó la fase superior (hidroalcohólica) y la inferior (clorofórmica) se llevó a sequedad, la que se redisolvió en 10 mL de isopropanol. De esta solución que está aproximadamente a 5 mg/ mL, se distribuyeron en alícuotas de 1 mL y se completaron a 5 mL con isopropanol para una concentración de 1 mg/ mL, se filtró por membrana de 0,2 nm.
- b) Preparación de los patrones

Se utilizaron patrones puros de la SIGMA de LPC, SM, PC, PS, PI, PE, y PG.

A partir de la solución madre de cada patrón puro, se prepararon soluciones de estos de 1mg/ mL, mediante la ley de la volumetría, para aplicar 20 ug en un volumen mínimo de inyección de 4 µL. Se utilizó como solvente isopropanol previamente filtrado por 0,2 µm.

c) Sistemas de separación:

Se evaluaron 11 diferentes sistemas, tomando elementos de lo informado en la literatura, fundamentalmente las fases móviles empleadas, que permitieran la separación de los diferentes fosfolípidos componentes del producto:

*Sistema 1:* Acetonitrilo/ metanol/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%) (100:1:1), con columna de silicagel Shim- pack CLC-SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min. *Sistema 2:* Acetonitrilo/ metanol/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%) (100:4:1), con columna de silicagel Shim- pack CLC-SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min. *Sistema 3:* Acetonitrilo/ metanol/ agua/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%) (80:18:1:0.75), con columna de silicagel Shim-pack CLC-SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min.

*Sistema 4:* Acetonitrilo/ propanol-2-ol/ metanol/ agua/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%) (135:20:10:7:1), con columna de silicagel Shim-pack CLC-SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min.

*Sistema 5:* Acetonitrilo/ metanol/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%)/ isopropanol/ agua (45:45:0.4:5:4), con columna de silicagel Nucleosil 100 Silica 5 um, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min.

*Sistema 6:* Acetonitrilo/ metanol/ agua (48:31:21), con columna de silicagel Shim-pack CLC-SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 2,3 mL/min.

*Sistema 7:* Acetonitrilo/ propan-2-ol/ metanol/ agua/ ácido trifluoracético (27:4:2:1.34:0.17), con columna de silicagel Shim-pack CLC-SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min.

*Sistema 8:* Hexano/ isopropanol/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%)/ etanol/ ácido acético (367:490:62:100:0.6), con columna de silicagel Shim-pack CLC-SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min.

*Sistema 9:* Acetonitrilo/ metanol/ agua (3:1:1), con columna de silicagel Shim-pack CLC- SIL, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 1,5 mL/min.

*Sistema 10:* Acetonitrilo/ metanol/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%) (100:100:0.9), con columna de silicagel Nucleosil 100 Silica 5 um, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5- 3 mL/min.

*Sistema 11:* Acetonitrilo/ metanol/ H<sub>3</sub>P0<sub>4</sub> (85%)/ isopropanol (45:45:0.41:9), con columna de silicagel Nucleosil 100 Silica 5 um, volumen de inyección de 4- 20 uL, y velocidad de flujo de 0,5-3 mL/min.

#### 2.1.4.2- Optimización del método

Se realizó el ajuste de los parámetros cromatográficos con vistas a garantizar la resolución adecuada entre los componentes, utilizando la siguiente ecuación (Quatrochi y col., 1992):

Donde:

$$R = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \sqrt{N} \frac{k'}{(1 + k')}$$

k': factor de capacidad  
N: factor de eficiencia (Número de platos teóricos)  $\alpha$ : factor de selectividad

Se calculó la resolución para los dos analitos de interés con respecto a sus picos más cercanos según:

$$R = \frac{t_2 - t_1}{w_2 - w_1} \times \frac{1}{1/2}$$

Donde:  
 $t_2$ : tiempo de retención del compuesto 2;  $t_1$ : tiempo de retención del compuesto 1;  $w_2$  ancho de la base del pico referente al compuesto 2; y  $w_1$  ancho de la base del pico referente al compuesto 1.

$$0.8 < R < 1.5$$

#### 2.1.4.3- Validación del método

Este es un método clasificado dentro de las categorías I y II de la USP XXIV, por lo que fue necesario la demostración de los parámetros: especificidad, precisión, linealidad, y límites de detección y cuantificación. Se utilizaron diseños experimentales sugeridos por Quatrochi y col. (1992).

##### a) Especificidad

Se diseñó el estudio con vistas a demostrar que las respuestas están dadas por la presencia de los diferentes fosfolípidos de la matriz y no por otros componentes del producto como proteínas, sales y ácidos grasos. Para lo cual se tomaron 10 bulbos de la matriz fosfolipídica objeto de estudio:

- 3 bulbos para estudio de fotólisis (Exposición del producto a luz de onda corta y/o solar directa o indirecta durante 5 h).
- 3 bulbos para estudio de Pirólisis (Exposición del producto a temperatura fija de 105 °C durante 5 h)
- 1 bulbo al que se le adicionará un 1 % de NaCL (0.9%)
- 1 bulbo al que se adicionará un 1 % de BSA
- 1 bulbo al que se le adicionará 1% de ácidos grasos (linoleico y palmítico)
- 1 bulbo control

Se realizaron las inyecciones de cada tipo de muestra por triplicado con vistas a determinar la presencia de algún pico nuevo y/o la superposición de algún componente con los picos de los PL de interés mediante CCD.

##### b) Precisión

###### b.1) Precisión del sistema en condiciones de repetibilidad

Se partió de una muestra homogénea para evaluar la dispersión de las medidas alrededor del valor medio, al analizar múltiples alícuotas de esta muestra. Se realizaron 10 inyecciones de cada muestra homogénea y se determinó el tiempo de retención ( $t_r$ ) de cada componente y el área (A) del pico de cada uno de ellos. Se determinó el estimador de la desviación estándar (S) para estos indicadores, para posteriormente conocer la desviación estándar relativa (RSD) o Coeficiente de Variación. Se estableció como límites de aceptación los valores de RSD < 5 % según Green (1996). b.2) Precisión del sistema en condiciones intermedias.

Se realizó el mismo diseño anterior con la introducción de las siguientes variaciones:

- \* Cambio de día de análisis
- \* Cambio de día y analista

Igualmente se calcularon la S y la RSD, debiendo tener, esta última, valores inferiores al 5 %.

c) Linealidad

Se utilizaron patrones comerciales puros de los diferentes fosfolípidos, se prepararon curvas de calibración de cada uno de ellos en los rangos en que ellos se encuentran normalmente en las muestras. Se realizaron 3 inyecciones (n=15) por cada nivel, se aplicaron 20 uL.

Se prepararon 5 niveles de concentración: PC (1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,125 mg/mL); LPC (0,25; 0,200; 0,150; 0,125; 0,120 mg/mL).

Se demostró la relación que existe entre la respuesta medida (área del pico) y la concentración de cada punto. Se calculó la recta de mejor ajuste, el coeficiente de determinación ( $r^2$ ), así como la variabilidad de la pendiente según procedimientos establecidos utilizando el sistema Microsoft Excel.

d) Límites de detección (LD) y cuantificación (LQ)

Se determinaron para la LPC ya que es el componente minoritario del producto y que constituye indicador de calidad a evaluar.

Se determinaron mediante la metodología sugerida por Quattrocchi y col., 1992. Se realizó una primera curva de calibración en el rango en que se encuentra la LPC en las muestras (0,120 - 0,25 ug/ uL), y se determinó la pendiente ( $m$ ). Se realizó otra curva de calibración a bajas concentraciones, se inyectaron cada punto de concentración por triplicado, y se determinó la ecuación de esta nueva recta, se extrapoló la respuesta a concentración igual a cero (el área es igual al intercepto b), obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco  $Y_{b,i}$ . Se determinó la desviación estándar (S) para cada punto de la curva anterior, y se calculó la recta correspondiente a Concentración (A) vs s, es decir, la ecuación  $S = m(A) + b$ , posteriormente se extrapoló la S a concentración igual a cero, obteniéndose el estimado  $S_{b,i}$ , correspondiente a la desviación estándar del blanco.

Se calcularon los  $LD$  y  $LQ$  para  $n$  medidas individuales según:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{m} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}} \quad LQ = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{m} \cdot \frac{1}{\sqrt{n}}$$

## **2.2- Obtención y caracterización de Materiales de Referencia Internos**

### **2.2.1- Evaluación de dos fuentes de obtención de fosfolípidos para la producción de MRI**

Para seleccionar la fuente de materia prima más factible se partió de material biológico (pulmones y tejidos de placenta) en todos los casos obtenidos en el laboratorio de control biológico del Grupo de Aseguramiento de la Calidad, a los cuales se les realizó una revisión anatomopatológica sin evidencia de alteraciones.

La fuente más apropiada fue seleccionada teniendo en cuenta criterios técnicos como: el rendimiento, y presencia de fosfolípidos de interés; y criterios económicos como: facilidad de adquirir dichas fuentes en mayor proporción; y el gasto de solventes orgánicos. Además, se evaluaron en las dos fuentes estudiadas el uso del sobrenadante (SN) y el precipitado obtenidos por centrifugación del homogenato, como parte del procedimiento general de trabajo. Los criterios de selección fueron: rendimientos de fosfolípidos y gastos de solventes orgánicos utilizados en las consecutivas extracciones.

El procedimiento común utilizado con las dos fuentes ensayadas se corresponde con la metodología empleada para las extracciones de fosfolípidos sugerida por Folch y col. (1957). Se tomaron 12 pulmones y 9 placentas, los cuales se pesaron en una balanza técnica obteniéndose una masa de 66,28 y 54,19 gramos respectivamente, posteriormente fueron triturados y lixiviados con solución de cloruro de sodio (0,9 %) durante 1 minuto en una batidora. La suspensión obtenida fue centrifugada a 4500 r.p.m. durante 30 minutos a una temperatura de 4°C, en una centrifuga refrigerada. El precipitado y el SN obtenidos fueron separados y sometidos a extracciones lipídicas.

Durante el proceso se tomaron alícuotas en las etapas posteriores a la trituración y centrifugación así como en las extracciones para determinar fosfolípidos totales como control del proceso siguiendo el método de Zilversmith (1950).

La composición de fosfolípidos fue determinada de forma cualitativa por cromatografía en capa delgada, utilizando la metodología descrita por Touchstone y col. (1980), la cual fue validada en la primera parte de este trabajo. Se utilizaron placas de silicagel -60 con zona concentradora. Se aplicaron los patrones de fosfolípidos obtenidos de la casa comercial Sigma y las muestras de la extracción final del precipitado y el SN de pulmón y placenta. Se reveló por el procedimiento específico con vapores de yodo como revelador. Se calcularon los  $r_f$  de los patrones comerciales y muestras como método de

identificación de los componentes fosfolipídicos presentes en la extracción final de pulmón y placenta.

## **2.2.2- Obtención y caracterización del MRI para métodos bioquímicos**

### **2.2.2.1- Obtención de los lotes de MRI**

Una vez seleccionada la mejor fuente siguiendo los criterios técnicos y económicos descritos anteriormente, se procedió a la definición del proceso, para lo cual se comenzó por una profunda revisión de los métodos de extracción y purificación de los compuestos de interés que incluyó la literatura de patente disponible, que nos permitiera la definición de cada una de las etapas, así como las diferentes operaciones y sus condiciones operacionales.

- Trituración: Se evaluaron tres variantes (tres corridas de cada una) para realizar la operación: Homogenizador mecánico a velocidad de 1300 r.p.m durante 5 minutos; Ultratur a altas r.p.m durante 5 minutos; y batidora a alta velocidad durante 3 minutos. Se tuvo en cuenta como criterio de selección práctico la variante que garantizara la mejor homogenización macroscópica del material biológico.
- Lixiviación: Se realizó en un tanque agitado de 5 L de capacidad con impelente de cuatro paletas. El solvente empleado fue solución de cloruro de sodio (150 mM) que es el utilizado universalmente para la obtención de los surfactantes naturales heterólogos. Se evaluaron los rendimientos a los 30, 60 y 120 minutos.
- Centrifugación: Se utilizó una centrífuga refrigerada de tubos (JOUAN) a 4°C. Se realizó una prueba de espín preliminar a velocidades de 2500 y 4500 r.p.m. para determinar el tiempo de la operación que lograra la separación requerida. Se evaluaron las fases pesada y ligera a los 10, 20 y 30 minutos.
- Extracción 1: Se realizó adicionado cuatro partes de solución de cloruro de sodio (150 mM) por cada parte de precipitado, homogenizándolo con agitación mecánica a velocidad de 200- 300 r.p.m. durante 30 minutos, y posterior adición de mezcla de cloroformo/metanol (2:1) a una relación solvente/ alimentación de 6. Se emplearon un tanque agitado y embudo separador de vidrio, para la separación de las fases, de 5 L de capacidades.
- Extracción 2: Se suspendió el extracto seco en solución salina y se realizó la extracción con mezcla de cloroformo/metanol (2:1) a una relación solvente/alimentación de 5, con agitación durante 30 minutos a 200- 300 rpm, en un tanque agitado de 5 L.
- Precipitación: Se utilizó acetona fría (- 20 °C), con un tiempo de contacto de 6 horas, y posterior centrifugación a 3000 rpm, a 4 °C durante 30 minutos (Alfonso, 1995).

Una vez establecida la tecnología de obtención del MRI de fosfolípidos, con todos los controles de proceso en cada una de las etapas críticas, se procedió a la elaboración de tres lotes con vistas a demostrar la reproducibilidad del proceso.

#### **2.2.2.2- Caracterización del MRI candidato**

La obtención de un MRI de fosfolípidos, a partir de una fuente biológica, requiere la demostración de una serie de parámetros bioquímicos y tecnológicos que demuestren que el producto es adecuado y estable para los fines propuestos, por lo que a continuación se abordarán todos los experimentos diseñados para caracterizar este producto. Debe señalarse que algunos de estos parámetros como: la concentración de fosfolípidos totales; el comportamiento cualitativo y cuantitativo de los diferentes fosfolípidos en CCD, especialmente la LPC (producto de degradación), la PC (componente mayoritario y principio activo), y la concentración de DPPC, fueron monitoreados en el tiempo (por un período de dos años como mínimo) con el fin de establecer la fecha de vida útil real del MRI, mediante un estudio de estabilidad en anaquel. Se utilizó el sistema estadístico SAS, Versión 8.2 para evaluar, mediante prueba t, el comportamiento de los diferentes indicadores de estabilidad en el tiempo.

☞ Homogeneidad del llenado: Se seleccionaron de forma aleatoria 10 frascos por cada lote y se pesaron en una balanza analítica antes y después del llenado, para controlar la variación en la cantidad de material entre un frasco y otro. Se determinó la media  $[X]$ , desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV), se tomaron como criterios de aceptación los sugeridos por Zanelli (1982).

☞ Homogeneidad del lote por determinación de fosfolípidos totales: Se realizó la determinación de fosfolípidos totales mediante el método de Zilversmith (1950), para esta determinación se escogieron 10 frascos de forma aleatoria por cada lote y se realizaron las determinaciones por triplicado. Se tomó como criterio de homogeneidad que la varianza entre los frascos sea menor o igual que la varianza de las réplicas dentro de los frascos (ISO Guía 35, 1998). En caso de demostrarse que los lotes son homogéneos se determina el intervalo de confianza para esta propiedad, en caso contrario se determina el intervalo de tolerancia.

☞ Humedad residual: Se determinó la humedad residual del material liofilizado por el método de Karl Fischer (USP XXIV, 2000), el valor obtenido debe ser menor del 5%, ya que niveles de humedad residual elevados, pudieran afectar la estabilidad microbiológica del MRI, además de catalizar la peroxidación e hidrólisis de los fosfolípidos.

☞ Límite microbiano: Se determinó la ausencia de microorganismos patógenos, realizando un muestreo de  $0,4 \wedge$  donde  $n$  es el tamaño del lote. Se tomaron los criterios de aceptación según la NC-26-121 (1993).

☞ Determinación cualitativa y cuantitativa de fosfolípidos: La composición de fosfolípidos fue determinada de forma cualitativa y cuantitativa por cromatografía en capa delgada (Touchstone y col., 1980). Se aplicaron las muestras de cada lote por duplicado contra una mezcla de MRC de fosfolípidos obtenidos de la casa comercial Sigma.

☞ Determinación cuantitativa de fosfolípidos disaturados: Se sometieron a ensayo cinco muestras tomadas aleatoriamente, las cuales se analizaron por duplicado, según la metodología propuesta por Mason y col. (1976), y validada en la primera parte de este trabajo.

### **2.2.3- Elaboración y caracterización del Material de Referencia Interno Biológico de fosfolípidos para método biológico (MRIB)**

#### **2.2.3.1- Obtención de los lotes de MRIB**

Para el diseño de este Material de Referencia Biológico se necesitaba lograr una matriz fosfolipídica donde la DPPC, como fosfolípido responsable de la actividad, se encontrara en niveles superiores al 40 % con respecto a los fosfolípidos totales, por lo que se requería una mínima contaminación de otros fosfolípidos de membrana. Debido al tamaño del pulmón de conejo, no fue posible el uso de la tecnología de SURFACEN que es por lavado pulmonar, por lo que fue necesario utilizar variantes tomando elementos de las tecnologías publicadas basadas en el procesamiento completo del órgano.

Se procedió al establecimiento del proceso, ajustando los parámetros de la trituración, lixiviación, y las centrifugaciones fundamentalmente. El resto de las operaciones se realizaron con el fin de lograr la purificación de la matriz y la eliminación de contaminantes como grasas, lípidos neutros y proteínas sanguíneas, por lo que se utilizaron métodos establecidos en el campo de obtención de surfactantes naturales.

#### **Condiciones experimentales de las etapas críticas en la tecnología de obtención del MRIB:**

- Trituración: Se utilizó una máquina moladora Hobart modelo 4812, empleando un plato de 4,7 mm de diámetro de orificio. Esta condición se estableció basado en el criterio de Treybal (1986) que propone tamaños de partículas de 1,2- 5,1 mm en la extracción de productos naturales.
- Lixiviación: Se empleó un tanque agitado de 50 L de capacidad con impelente de cuatro paletas. El solvente empleado fue solución de cloruro de sodio (150 mM), el porcentaje volumétrico de sólidos (15 %) se estableció tomando los criterios de Fujiwara y col. (1982) que proponen un 20%; y Díaz (1999), que utilizó un 10 %, ambos con resultados satisfactorios. El tiempo de agitación fue de 1 hora. Se realizaron 10 corridas experimentales para determinar el rendimiento de esta etapa crítica.

- Filtración: Se realizó a gravedad a través de un colador con un orificio de diámetro de 1,3 mm (12 mesh).
- Centrifugación 1: Se utilizó una centrífuga de discos, operando como clarificadora, a una velocidad de 9000 rpm y un flujo de 400 ml\_/ min. Estas condiciones son similares a las que reportan Robertson y Curstedt (1988).
- Centrifugación 2: Se utilizó la misma centrífuga anterior operando como concentradora, a una velocidad de 6000 rpm y un flujo de 200 mUmin, condiciones propuestas por Díaz (1995) para la obtención de SURFACEN.

Una vez establecida la tecnología de obtención del MRIB de fosfolípidos, con los controles de procesos de cada una de las etapas críticas, se procedió a la obtención de al menos dos lotes con vistas a demostrar la reproducibilidad del proceso.

#### **2.2.3.2- Caracterización del MRIB candidato**

Para la caracterización del MRIB candidato, se evaluaron todos los indicadores bioquímicos que son correlacionados e imprescindibles para lograr una adecuada actividad surfactante en el modelo biológico seleccionado (Método de Gazapos inmaduros), además de la propiedad fundamental que es la de demostrar actividad surfactante en este modelo. Debe señalarse que algunos de estos parámetros como: el comportamiento cualitativo y cuantitativo de los diferentes fosfolípidos en CCD, especialmente la LPC (producto de degradación), la PC (componente mayoritario y principio activo), la concentración de DPPC y la acción biológica, serán monitoreados en el tiempo (por un período de dos años como mínimo) con el fin de establecer la fecha de vida útil real del MRIB, mediante un estudio de estabilidad en anaquel.

Para la evaluación de la actividad biológica se tomaron aleatoriamente tres muestras de cada lote y se les midió la actividad biológica por el Método de Gazapos inmaduros (Robertson y Lachaman, 1988), para conocer la posibilidad real de uso del candidato a MRIB como control positivo de este método biológico.



# ***CAPITULO 3***

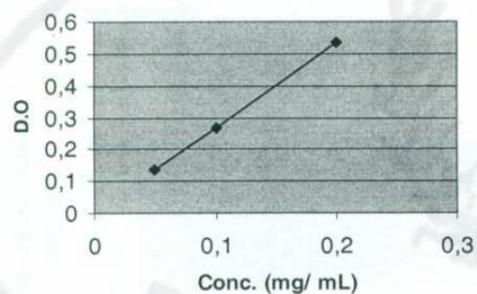
### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1- Validación de los métodos analíticos

##### 3.1.1- Cuantificación de fosfolípidos totales

Al procesar estadísticamente los resultados obtenidos del estudio de *linealidad* se comprobó el comportamiento lineal del sistema (Figura 2), observándose que existe una correlación entre la densidad óptica y la concentración en el rango estudiado, obteniéndose la ecuación de la recta  $y=0,002+ 2,727x$ , donde los coeficientes de determinación y correlación ( $r^2$  y  $r$ ) fueron mayor de 0,9999; el intercepto, no difirió significativamente de cero; sin embargo la pendiente difirió estadísticamente del valor ideal, este comportamiento conlleva a que pequeños cambios en la concentración involucran grandes cambios en la respuesta, lo que le confiere una alta sensibilidad al método, lo que demostró la capacidad de este de asegurar que los resultados analíticos obtenidos son proporcionales a la concentración del analito dentro del intervalo de 0,05-0,20 mg/ mL de fósforo (Gil, 1995 y González, 1996).

$$y= 0,002+2,727 x \text{ } r^2= 0,9999$$



**Figura 2: Curva de calibración de la linealidad del método de fosfolípidos totales**

Los resultados demuestran que el método es lineal en el rango de concentraciones de la curva patrón (0,050-0,20 mg/mL), demostrándose de esta forma que el ensayo cumple apropiadamente con la Ley de Lambert-Beer, lo cual indica que se pueda usar la absorbancia como magnitud apropiada para determinar a partir de ella la concentración de principio activo presente en las muestras (Massart, 1994). Los resultados de las D.O obtenidas para valores de concentraciones superiores a los 0,25 mg/ mL de fósforo afectan ligeramente la linealidad del método y su sensibilidad, por lo que en muestras de estas concentraciones se sugiere la realización de diluciones.

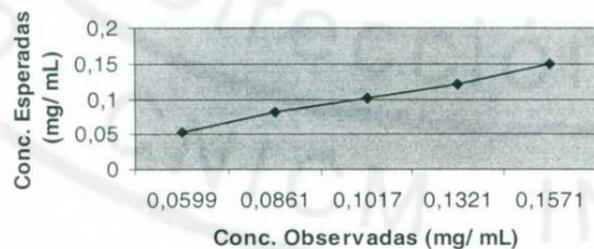
Los resultados del estudio de *exactitud* (Tabla 2), demuestran que el procedimiento en estudio es exacto, pues los porcentajes de recobrado obtenidos se encuentran en el rango establecido para este tipo de método (>80%) (Thomas y col., 1991). Algunos autores plantean la aceptación de valores de recobrado no menores de 50, 80 y 90 %, como límites de aceptación numéricos en dependencia de la complejidad del método (Castro y col., 1989; y Campmany, 1990), y otros autores refieren altos recobrados para métodos espectrofotométricos simples (Rodríguez y col., 2003).

**Tabla 2: Exactitud del método de cuantificación de fosfolípidos totales**

Niveles	Valores observados (mg/mL)	Valores esperados (mg/mL)	Recobrado (%)
1	0,0599	0,0538	111,3
2	0,0861	0,0823	104,6
3	0,1017	0,1016	100,1
4	0,1321	0,1219	109,3
5	0,1571	0,1495	105,1 -

% recobrado = 106,08 %.

Al analizar la relación existente entre las concentraciones esperadas y observadas (Figura 3), se obtuvo una línea recta cuyo coeficiente de correlación fue de 0,99; corroborando la exactitud del método.



**Figura 3: Curva de recuperación de la exactitud del método de fosfolípidos totales**

El estudio de *precisión* realizado bajo condiciones de *repetibilidad* (Tabla 3), permitió conocer la S y el CR bajo condiciones óptimas (analista, equipo, reactivo, día idéntico), tomándose los resultados de tres estudios de repetibilidad. De esta forma se pudo conocer la máxima diferencia permisible entre réplicas, primer factor a tener en cuenta por el analista para conocer sobre la validez del ensayo.

El procesamiento estadístico de los resultados del ensayo de **precisión en condiciones intermedias** (Tabla 3), muestra que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), al aplicar la prueba t, no solo entre las diferentes condiciones analizadas, sino que no difirió tampoco con los resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad, lo que permitió demostrar la robustez del método, puesto que los resultados demostraron que las respuestas obtenidas mediante la ejecución de dicho ensayo, no son afectados por pequeñas variaciones en las condiciones de trabajo, es decir, cambio de operador, día de análisis, reactivos, equipos, y combinaciones de estas (Pasteelnik, 1993).

**Tabla 3: Precisión del método de cuantificación de fosfolípidos totales**

Condiciones	S(roi)	CR (A)
<b>Repetibilidad</b>	* Operador, día, equipo, y lote de reactivos idénticos	0,2115
	* Un analista, dos días diferentes con lotes de reactivos idénticos (T)	0,1642
	* Dos analistas, un mismo día (O)	0,1835
<b>Intermedias</b>	* Un analista, dos días diferentes, con lotes de reactivos diferentes (R, T)	0,1719
	* Dos analistas, dos días diferentes con lotes de reactivos idénticos (O, T)	0,1857
	* Un analista, dos días diferentes con diferente equipo (T, E)	0,1769

S(roi): Desviación estándar en condiciones de repetibilidad (r) o en condiciones intermedias (i) CR (A): Rangos críticos expresados en unidades de absorbancia

La **selectividad** del método quedó demostrada al no observarse diferencias estadísticamente significativas, después de aplicar el test de Wilcoxon (test no paramétrico para  $n$  pequeñas), entre la muestra normal y la muestra contaminada con otros lípidos y

proteínas presentes en la matriz estudiada (Tabla 4), por lo que podemos concluir que el método es capaz de discriminar entre el principio activo y demás componentes del producto, cumpliendo de esta forma con el ensayo de selectividad, asegurando el hecho de estar determinando exclusivamente la sustancia de interés (Pasteelnik, 1993; Finkelson, 1994).

**Tabla 4: Resultados del ensayo de selectividad del método de cuantificación de fosfolípidos totales**

Muestra	Concentración (mg/mL)	X	DS
Normal	4,24	4,25	0,0755
	4,18		
	4,33		
Contaminada	4,03	4,20	0,2194
	4,45		
	4,13		

X : Valor medio DS: Desviación Standard

### 3.1.2- Separación y cuantificación de fosfolípidos disaturados

Como se explica en Materiales y métodos, esta técnica se divide en tres etapas:

- 1 -Preparación de la muestra.
- 2- Separación de la DPPC por cromatografía de columna.
- 3- Detección y cuantificación espectrofotométrica a 660 nm.

En el epígrafe 3.1.1 se informaron los resultados de la validación de la tercera etapa de esta técnica, lo que demostró algunos indicadores de calidad como es la linealidad en el intervalo (0,066-0,20 mg/mL), siendo este también el rango de interés en el ensayo para la cuantificación de DPPC, por lo que se evidenció la relación existente entre la respuesta (DO) y la concentración del analito (Massart y Verbeke, 1994).

El diseño del estudio de la *exactitud* del método (Variante 1), variante en la cual se adicionaron los diferentes volúmenes de solución madre de patrón de DPPC (100 mg/mL), al inicio de la preparación de la muestra (Figura 1), evidenció porcentajes de recobrado menores del 40% (Tabla 5); observándose una pérdida significativa del analito correspondiente a las etapas de extracción con solventes orgánicos y separación de este en el sistema trifásico (cloroformo- metanol- agua).

Tabla 5: Resultados del ensayo de exactitud de la variante 1

Niveles	Masa de DPPC añadida (mg)	Masa de DPPC recuperada (mg)	Recobrado (%)
1	5	1,71	34,2
2	7,5	1,98	26,4
3	10	2,13	21,3

% recobrado = 27,30

En el caso de la evaluación de la exactitud de la columna (Variante 2), variante en la cuál se adicionaron a las muestras los diferentes volúmenes de solución madre de patrón (DPPC) (100 mg/mL), justo antes de la aplicación de esta a la columna, se registraron porcentajes de recobrado >87.9% (Tabla 6), resultados que concuerdan con los obtenidos por Badar (1995); Backer y Vermeersch (1996); Ang y Luo (1997), quienes reportaron porcentajes de recobrado >85% en la validación de métodos cromatográficos líquidos.

Tabla 6: Resultados del ensayo de exactitud de la variante 2

Niveles	Valores observados (mg/mL)	Valores esperados (mg/mL)	Recobrado (%)
1	32,80	33,68	97,40
2	38,10	41,68	91,40
3	40,15	45,68	87,90

% recobrado = 92,23

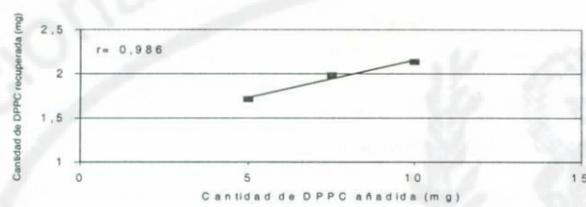
Al analizar los porcentajes de recobro obtenidos en ambas variantes, se observó una tendencia a la disminución de los valores de recobrado con el aumento de la concentración de los diferentes niveles estudiados, lo que concuerda con lo planteado por Badar (1995), para este tipo de método. En este caso, puede ser debido a una saturación de la solución acomplejante de tetraóxido de osmio en la columna, siendo más exacto el método a bajas concentraciones.

Las pérdidas que se producen durante la preparación de las muestras, fundamentalmente en la extracción (variante 1), no aseguran un recobrado adecuado del analito, por lo que en condiciones de trabajo no se recomienda para determinar su concentración absoluta. Sin embargo, es posible expresar los resultados como porcentaje en base a los fosfolípidos totales, teniendo en cuenta que la separación cromatográfica (variante 2), presentó buena recuperación. Mediante la ejecución de esta técnica podemos conocer el porcentaje de DPPC (D<sub>O2</sub>) con respecto a los fosfolípidos totales (D<sub>O<sub>i</sub></sub>), ya que ambos son sometidos a

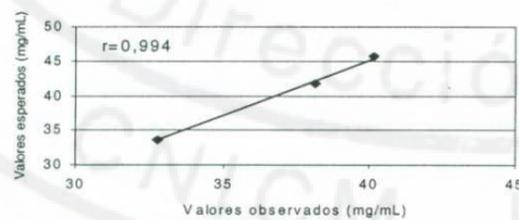
todo el proceso de preparación de la muestra (Figura 1), por lo que las pérdidas son equivalentes.

Estos resultados demuestran que el método es poco exacto, sugiriéndose por tanto, su uso solamente en el caso que se necesite cuantificar el porcentaje de DPPC con respecto a los fosfolípidos totales, como es el caso.

En las figuras 4 y 5, se presentan las rectas obtenidas al relacionar las concentraciones de DPPC observadas con las esperadas, para ambas variantes, demostrándose que en la variante 1 (método completo), no existe una buena correlación entre ambas concentraciones, corroborado por la pendiente ( $m=0,084$ ) que difiere significativamente de 1 tras aplicar la prueba t, mientras que en la variante 2, la pendiente ( $m= 1,608$ ) no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a este valor.



**Figura 4: Curva de recuperación del ensayo de exactitud de la variante 1 del método de cuantificación de la DPPC**



**Figura 5: Curva de recuperación del ensayo de exactitud de la variante 2 del método de cuantificación de la DPPC**

El ensayo de *repetibilidad* (Tabla 7), permitió conocer la  $S_r$  y CR indicando así el grado de dispersión o concordancia de los resultados del método bajo condiciones óptimas de trabajo (analista, día, equipo y reactivos idénticos). La máxima diferencia permisible entre réplicas (CR), está expresada para el resultado final del ensayo en unidades de concentración relativa (porcentaje de DPPC con respecto a fosfolípidos totales).

El procesamiento estadístico de los resultados de la *precisión bajo condiciones intermedias* (Tabla 7), muestra que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad y los obtenidos al realizar el ensayo cuando se varió el factor tiempo (T), lo que indica que el método estudiado no es influenciado por este factor.

**Tabla 7: Precisión del método de cuantificación de la DPPC**

Condiciones		$S_{(r \text{ o } i)}$	CR
Repetibilidad	* Operador, día, equipo y lote de reactivo idénticos	1,73	3,80
		1,95	4,29
Intermedias	* Un analista, dos días diferentes con lotes de reactivos idénticos	1,78	3,90

$S_{(r \text{ o } i)}$  Desviación estándar en condiciones de repetibilidad (r) o en condiciones intermedias (i)  
 CR (% DPPC/PL): Rangos críticos expresados en unidades de concentración relativa de la DPPC con respecto a los fosfolípidos totales

El factor analista no fue evaluado porque el método siempre es realizado por dos analistas; los restantes factores fueron objeto de análisis en la primera parte de este capítulo.

Los resultados del ensayo de *especificidad* (Tabla 8), demostraron que no existen diferencias significativas entre la muestra normal y la muestra contaminada con proteínas y otros fosfolípidos excepto DPPC, presentes en el producto, resultados que permiten corroborar que el método es específico, asegurando el hecho de estar determinando únicamente la sustancia de interés, en este caso, la DPPC.

Debe señalarse que este ensayo está descrito para la cuantificación de fosfolípidos disaturados, por lo que es válido para la separación y cuantificación relativa de la DPPC porque se conoce por los estudios de la caracterización del producto en sistema de cromatografía de placa delgada específica, que este es el único fosfolípido disaturado presente en el mismo (Alfonso, 1997).

Tabla 8: Especificidad del método de cuantificación de la DPPC

Muestra	Concentración (% DPPC/PL)	X	CR
Normal	38,9	37,8	2.1
	36,8		
Contaminada	37,1	37,4	0.5
	37,6		

CR: Rango crítico expresado en unidades de porcentajes de DPPC con respecto a fosfolípidos totales

### 3.1.3- Identificación y cuantificación de fosfolípidos por CCD

La *linealidad* del método se comprobó procesando estadísticamente los resultados obtenidos de la curva de calibración para los seis niveles de concentraciones. Se obtuvo una recta  $Y = 0,1526 X + 0,0117$ ; donde el coeficiente de correlación fue de 0.999. Se evidenció que el intercepto no difirió significativamente de cero, y la pendiente si lo hizo de uno, lo que indica que grandes cambios en la concentración producen pequeños cambios en la respuesta (D:0), este resultado aunque no coincide con los reportados en la literatura (Massart y Verbeke, 1994), es un comportamiento característico de métodos de baja sensibilidad. Un resultado importante fue la demostración de la linealidad del ensayo en el rango de trabajo, no se recomienda trabajar por encima de 0,05 mg/ mL de fósforo porque no se conserva la linealidad.

En el diseño del estudio de *precisión* se evaluó la variabilidad del método en condiciones óptimas y cuando se introdujeron las fuentes de variación de mayor influencia en la práctica según las características de este tipo de método.

El ensayo de *repetibilidad* (Tabla 9), permitió conocer la  $S_r$  y CR indicando así el grado de dispersión o concordancia de los resultados del método bajo condiciones óptimas de trabajo (analista, día, equipo y reactivos idénticos) para cada uno de los componentes. La máxima diferencia permisible entre réplicas (CR), se expresó en unidades de absorbancia (A), ya que los datos primarios son lecturas de densidades ópticas, y constituyen el primer indicador de la conformidad técnica del ensayo, que le permiten al analista decidir si el ensayo cumplió con sus requisitos de calidad o no, orientando en el segundo caso la necesidad de ejecutar una reprobación del mismo.

Los resultados del análisis estadístico, mediante la prueba t, de tres muestras por duplicado (n=6), de un lote homogéneo, contra dos columnas blanco (máxima capacidad de análisis de

una placa), evidenciaron que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las desviaciones estándar de repetibilidad de los diferentes componentes, este resultado hace pensar en una posible interrelación entre la variabilidad del ensayo y las concentraciones de los analitos, evidenciándose una tendencia a aumentar la variabilidad en los puntos de mayor concentración. Este resultado coincide con lo reportado por Castro y col. (1989), acerca del aumento de la variabilidad de los resultados con la concentración de analito.

**Tabla 9: Resultados de la repetibilidad del ensayo de CCD**

Condiciones	Punto	$S_r$	CR (A)
REPETIBILIDAD	Lisofosfatidilcolina	0,009	0,020
	Esfingomielina	0,022	0,048
	Fosfatidilcolina	0,019	0,042
	Fosfatidilserina	0,020	0,044
	Fosfatidilinositol	0,014	0,031
	Fosfatidiletanolamina	0,010	0,022
	Fosfatidilglicerol	0,011	0,024
	Frente	0,009	0,020

$S_r$ : Desviación estándar en condiciones óptimas (repetibilidad)

CR (A): Rangos críticos expresados en unidades de absorbancia

Sin embargo, el procesamiento estadístico de los resultados de la *precisión bajo condiciones intermedias* (Tabla 10), muestra que no existe diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad y los obtenidos al realizar el ensayo variando los factores tiempo- reactivos  $S_i$ (TR), al comparar cada componente individualmente, con excepción de la fosfatidiletanolamina cuyo rango crítico se duplica al introducir estas condiciones. Estos resultados indican que el método estudiado no es muy influenciado por este factor, sugiriéndose el estudio de la influencia de factores ambientales como la temperatura, la humedad y la presión atmosférica.

Los resultados de los LD y LQ generaron valores de  $1,3 \times 10^{-4}$  y  $8,8 \times 10^{-5}$  mg de fósforo, respectivamente, al extrapolar en una curva de calibración de bajas concentraciones el valor de  $X_B + 3 DS_B$  y  $X_B + 10 DS_B$  en unidades de absorbancia, para LD y LQ respectivamente ( $X_B$ : valor medio de diez determinaciones del blanco,  $DS_B$ : Desviación estándar de esas diez determinaciones), estos resultados coinciden con los obtenidos por Ouhazza y Siouffi

(1992), quienes reportaron LD iguales a 0,8 ug en un método en el cual la detección fue por fluorescencia.

**Tabla 10: Resultados de la precisión en condiciones intermedias del método de CCD**

Condiciones	Punto	S <sub>i</sub> (TR)	CR (A)
INTERMEDIAS	Lisofosfatidilcolina	0,013	0,029
	Esfingomielina	0,023	0,050
	Fosfatidilcolina	0,041	0,051
	Fosfatidilserina	0,017	0,037
	Fosfatidilinositol	0,016	0,035
	Fosfatidiletanolamina	0,022	0,048
	Fosfatidilglicerol	0,012	0,026
	Frente	0,014	0,031

S<sub>i</sub> (TR): Desviación estándar en condiciones intermedias cuando se varía el reactivo color y el día de análisis

CR (A): Rango crítico expresados en unidades de absorbancia

El límite de detección cualitativo (LDC), evidenció, para los dos analistas independientes, resultados idénticos (Tabla 11).

**Tabla 11: Resultados del límite de detección cualitativo del método de CCD**

Patrón	Tf	Blanco	MRI	3	4	5	6	7	8	9	10	LDC
LPC	0,166	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	12,5 ug
PS	0,388	—	+	-+	-+	+	+	+	+	+	+	6,0 ug
PI	0,444	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	7,5 ug
PE	0,650	—	+	-+	-+	+	+	+	+	+	+	6,0 ug
PG	0,700	—	—	-+	-+	+	+	+	+	+	+	6,0 ug

+: evidencia de mancha

— ausencia de mancha

-+: apreciación dudosa

Columnas 3-10: Columnas en las que se puntearon diferentes volúmenes de muestras según Tabla 1.

Es importante señalar que el análisis cualitativo necesita entrenamiento visual de los analistas porque el contraste que se logra debido a la unión de los diferentes analitos con el

revelador (Iodo sublimado) es muy débil (amarillo- blanco), además de que este último tiende a sublimarse y a aclarar la intensidad de las manchas en un período de tiempo corto. En las tres réplicas del experimento se obtuvieron los mismos resultados, considerándose los resultados dudosos (-+) como negativos, ya que no permitieron dilucidar claramente la presencia o ausencia del componente de interés. Se tomaron como límites de detección cualitativo (LDC) la mínima cantidad de sustancia (mg) que fue necesario aplicar en la placa para que se detectara nítidamente inmediatamente después del revelado. Este resultado a diferencia de lo informado por Caporal y col. (1990), y Pasteelnik (1993), se expresa en unidades de masa, ya que de esta forma, en dependencia de la concentración del patrón puro, se puede ajustar el volumen de aplicación para lograr puntear como mínimo la masa requerida.

Los resultados del estudio de *especificidad* demostraron la ausencia de interferencias de otros componentes no fosfolipídicos presentes en el producto (Tabla 12), al no evidenciarse ninguna mancha adicional en el perfil cromatográfico, además de que estos contaminantes de forma independiente no ofrecieron respuesta. No fue necesario realizar la cuantificación porque no fueron detectados. Estos resultados corroboran que tanto el sistema de corrida como de revelado son específicos para el análisis cualitativo de fosfolípidos (Touchstone, 1980)

**Tabla 12: Resultados de la especificidad del método de CCD**

Mancha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LPC	-	-	+	+	+	+	+	+	—	-
SM	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
PC	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
PS	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
PI	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
PE	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
PG	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
Otra	-									-

1, 2: Blanco 3,4: Muestras normales 5,6: Muestras contaminadas con ácidos grasos (oleico y linoleico)

7, 8: Muestras contaminadas con proteína (BSA) 9, 10: Mezcla de los contaminantes

### 3.1.4- Estandarización, optimización y validación del método de análisis de fosfolípidos por CLAR

Se evaluaron diferentes sistemas de separación tomando elementos de lo reportado en la literatura, no lográndose la separación de los componentes con estos sistemas como estaban descritos.

La principal limitante fue la poca disponibilidad de solventes transparentes a esta longitud de onda de 200 nm, para lo cual los solventes óptimos se reducen a: n- hexano, isopropanol, acetonitrilo, y agua. Esto unido a la complejidad real de separación de este tipo de compuestos dado por la gran similitud en las propiedades químicas y físicas que dificultan la separación de cada componente de la mezcla, y las características del equipamiento disponible, conllevaron a un arduo trabajo experimental.

De las fases móviles probadas se seleccionó la siguiente: Acetonitrilo/Metanol/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85 %) (1:1:0.01).

Finalmente se estableció el sistema analítico siguiente:

CLAR fase normal (Mecanismo adsorción) isocrático.

Detector: Fotómetro 200 nm.

Columna: Silicagel (Shim-pack CLC-SIL, 5  $\mu$ m diámetro de partícula, 6 mm ID X 15 cm)

Condiciones de conservación de la columna: n-hexano/ Isopropanol (99.5: 0.5)

Caudal o velocidad de flujo: 0,5 mLV min.

Cantidad de muestra a inyectar: hasta 100  $\mu$ g en 4  $\mu$ L de cada patrón puro.

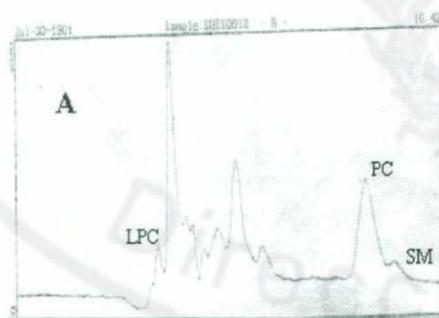
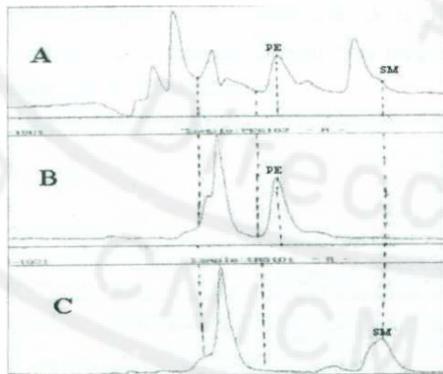


Figura 6: Cromatograma de la separación de los fosfolípidos (Surfacen 1 mg/ mL)

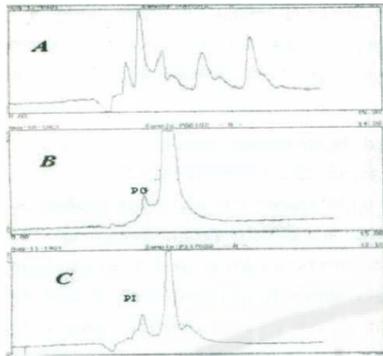
El sistema propuesto permitió la separación de los principales compuestos del producto obteniéndose picos bien definidos y resueltos para la LPC y PC y para el resto de los fosfolípidos (Figuras 6, 7 y 8). El tiempo de corrida para la separación de los compuestos fue de 13 minutos (Tabla 13).

**Tabla 13: Resultados cualitativos de la separación por CLAR**

Componente	Tiempo de retención ( $t_R$ )
Lisofosfatidilcolina	4,26 $\pm$ 0,044
Fosfatidilinositol	5,29 $\pm$ 0,014
fosfatidilglicerol	5,36 $\pm$ 0,010
Fosfatidiletanolamina	7,38 $\pm$ 0,029
Fosfatidilserina	8,41 $\pm$ 0,014
Fosfatidilcolina	10,17 $\pm$ 0,041
Esfingomielina	10,76 $\pm$ 0,031

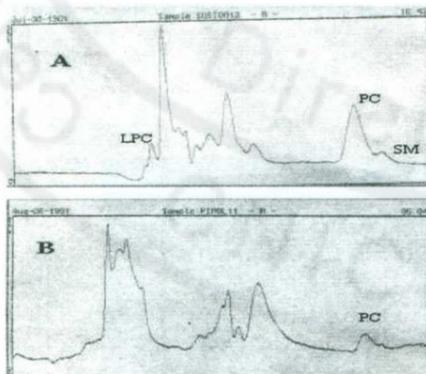


**Figura 7: Cromatogramas de la separación de los fosfolípidos A: SURFACEN (4 mg/mL) B: Patrón de Fosfatidiletanolamina (PE) C: Patrón de Esfingomielina (SM)**



**Figura 8: Cromatogramas de la separación de los fosfolípidos mediante el sistema propuesto A: SURFACEN (4 mg/mL) B: Patrón de Fosfatidilglicerol (PG) C: Patrón de Fosfatidilinositol (PI)**

Los resultados del estudio de **especificidad** mostraron que el método es específico para el análisis de fosfolípidos, puesto que se obtienen picos a diferentes tiempos de retención para cada uno de ellos, mientras que otros componentes del producto como las proteínas y los ácidos grasos no mostraron señal a esta longitud de onda. Sin embargo, los estudios de pirólisis (Figura 9), corroboraron la degradación total del producto, observándose la formación de formas liso directamente proporcional a la disminución de la concentración de cada uno de los fosfolípidos.



**Figure 9: Cromatogramas del estudio de pirólisis A: SURFACEN (1 mg/mL) B: SURFACEN sometido a condiciones de estrés por temperatura**

Los cromatogramas del estudio de fotólisis no evidenciaron la formación de productos de degradación, por lo menos en las cantidades que pudieran ser detectados puesto que no existe diferencias estadísticamente significativas entre las muestras expuestas y la muestra control.

La evaluación de la *linealidad* del método se realizó mediante curvas de calibración de los patrones puros. Se establecieron los rangos de trabajo de comportamiento *lineal* para los dos analitos que constituyen indicadores de calidad del producto, siendo de  $(0,78- 12,5) \times 10^2$  mg/ mL para la fosfatidilcolina y de 0,0625- 1 mg/ mL para la lisofosfatidilcolina. Los resultados de la curva de calibración para ambos compuestos (Figuras 10 y 11) muestran un comportamiento lineal con un coeficiente de correlación superior a 0,99; y la variabilidad de la pendiente para ambos analitos fue inferior al 1 %, lo que ratifica la linealidad del método en el rango de trabajo.

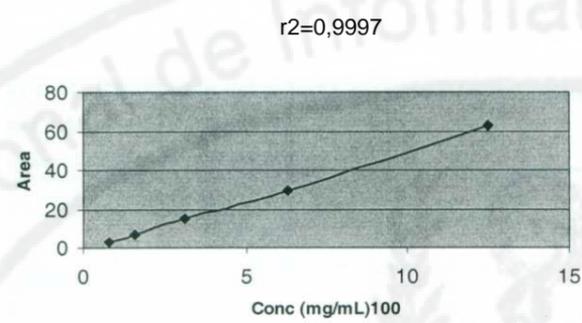


Figura 10: Curva de calibración de la linealidad de la Fosfatidilcolina

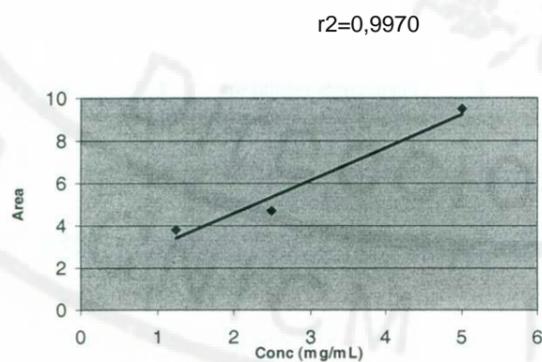


Figura 11: Curva de calibración de la linealidad de la lisofosfatidilcolina

El estudio de *precisión* realizado bajo condiciones de *repetibilidad* (Tabla 14), permitió conocer la  $S_r$  y el CV bajo condiciones óptimas (analista, equipo, fase móvil, día idéntico), tomándose los resultados de dos estudios de repetibilidad.

El procesamiento estadístico de los resultados del ensayo de *precisión en condiciones intermedias* (Tabla 14), muestra que no existe diferencias significativas, al aplicar la prueba t, no solo entre las diferentes condiciones analizadas, sino que no difirió tampoco con los resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad, lo que permitió demostrar la robustez del método, puesto que los resultados indican que las respuestas obtenidas mediante la ejecución de dicho ensayo, no son afectados por pequeñas variaciones en las condiciones de trabajo, es decir, cambio de operador, día de análisis, y operador- día de análisis (Pasteelnik, 1993). Los valores de coeficientes de variación (CV) evidencian que el método es preciso, tomando en cuenta las recomendaciones de autores que sugieren criterios de aceptación válidos de precisión para métodos cromatográficos cuando los CV son menores del 2 % (Green, 1996).

**Tabla 14: Resultados del estudio de precisión del método de análisis de fosfolípidos por CLAR**

Condiciones		$S_{(r j)}$	CV (%)
Repetibilidad	* Operador, día, equipo, y lote de reactivos idénticos	(LPC) 0,0508	1,42
		0,0312	0,9
	(PC) 0,1011	1,00	
		0,0168	0,17
Intermedias	* Un analista, dos días diferentes con lotes de reactivos idénticos (T)	(LPC) 0,0430	1,20
		(PC) 0,1905	1,92
	* Dos analistas, dos días diferentes con lotes de reactivos idénticos (0, T)	(LPC) 0,0430	1,21
		(PC) 0,1905	1,92

$S_{(r|j)}$ : Desviación estándar en condiciones de repetibilidad (r) o en condiciones intermedias (i)

CV (%): Coeficiente de variación

Por otra parte, el método demostró límites de detección y cuantificación adecuados para la lisofosfatidilcolina en el orden de los 24 y 78 ng, respectivamente. Estos resultados

concuerdan con lo informado por Christie (1992) quien reporta que estos compuestos son detectados a bajas longitudes de ondas (200-206 nm) en la región ultravioleta en cantidades del orden de los nanogramos.

#### **CONCLUSIONES PARCIALES:**

- La técnica espectrofotométrica de cuantificación de fosfolípidos totales, cumplió con los indicadores establecidos por la USP XXIV, ya que presentó adecuadas *exactitud* (>80%); *precisión*, medida como repetibilidad y condiciones intermedias, *robustez*, y *selectividad*.
- El ensayo cromatográfico de separación y cuantificación de la DPPC, evidenció *porcentajes de recobro* de la separación cromatográfica aceptables, adecuadas *precisión*, tanto en condiciones intermedias y de repetibilidad, *especificidad* y *linealidad*.
- El método de análisis cualitativo y cuantitativo de los fosfolípidos por cromatografía de capa delgada resultó *lineal* en el rango de  $(0,10- 5) \times 10^{-2}$  mg/ mL de fósforo, *preciso*, *sensible*, y *específico*, además de mostrar los *LD* y *LQ* adecuados para el uso previsto.
- El método de análisis de fosfolípidos por CLAR demostró ser *lineal* para los dos compuestos de interés con  $r^2 > 0,99$ ; ser *específico* y *preciso*, así como presentar *límites de detección* y *cuantificación* adecuados para el producto de degradación.

#### **3.2- Obtención y caracterización de Materiales de Referencia Internos**

##### **3.2.1- Evaluación de las fuentes de materia prima**

Las determinaciones de fosfolípidos totales durante el control de proceso (Tabla 15) evidencian que la primera y segunda extracción obtenida a partir del precipitado tiene una concentración de fosfolípidos totales mayor que la obtenida en el sobrenadante (SN), este comportamiento fue similar en ambas fuentes. Sin embargo, la primer extracción a partir del precipitado de pulmón fue más eficiente que en el precipitado de placenta. Estos resultados pueden ser debido a las características diferentes de ambos órganos, que a pesar de que se realizaron las mismas operaciones de trituración y lixiviación previas a la operación de centrifugación, aspectos críticos como la masa de sólidos, tamaños de partículas, así como la densidad de los sólidos fue diferentes, lo que favoreció que en la operación de centrifugación precipitarán otros componentes de células y tejidos de la placenta lo que provocó pérdidas de fosfolípidos en este órgano.

Este resultado resalta la importancia de las condiciones de centrifugación en el rendimiento final, ya que en dependencia de las características de los sólidos se logrará la eficiencia de la separación. Varios autores le confieren a esta operación un papel crítico en la separación de estos compuestos (Magoon y col., 1983; Wright y Clements, 1987; Young,

1989), utilizándose ampliamente la centrifugación por gradiente de densidad.

El análisis de los rendimientos de la extracción final (Figura 13) con respecto a fosfolípidos totales iniciales, muestran mayores valores para el precipitado con respecto al SN, aunque, para el caso del precipitado de placenta estas diferencias no son significativas. También en el proceso se obtuvieron grandes volúmenes de SN que provocó la utilización de mayor cantidad de solventes, los cuales encarecen los pasos de extracción. Este análisis nos llevó a desechar el SN como vía de obtención de los fosfolípidos.

Durante el procesamiento del precipitado, se observó, que en el caso del pulmón la concentración de fosfolípidos de la primera extracción con respecto a la segunda disminuyó prácticamente a la mitad (Tabla 15), esto puede haber ocurrido porque la fase clorofórmica estaba saturada de fosfolípidos, y en la segunda extracción hubo mucha migración de dichos componentes hacia la fase metanólica, donde son parcialmente solubles. En el caso de la placenta no se observó el mismo comportamiento debido a que la concentración de fosfolípidos es menor y no ocurre la sobresaturación. Estos resultados se tomaron en cuenta para la estandarización del proceso de elaboración de los lotes de material de referencia.

**Tabla 15: Determinación de fosfolípidos totales en las etapas del proceso de evaluación de las fuentes**

ETAPAS	Pulmón		Placenta	
	Masa total (mg)	Concentración (mg/mL)	Masa total (mg)	Concentración (mg/mL)
Triturado	1484,70	5,60	1116,3	5,15
1 <sup>era</sup> Extracción (Precipitado)	628,45	4,23	180,20	2,34
1 <sup>era</sup> Extracción (Sobrenadante)	225,40	0,28	159,6	0,24
2 <sup>da</sup> Extracción (Precipitado)	378,85	2,55	163,80	2,34
2 <sup>da</sup> Extracción (Sobrenadante)	214,70	0,23	140,40	0,16

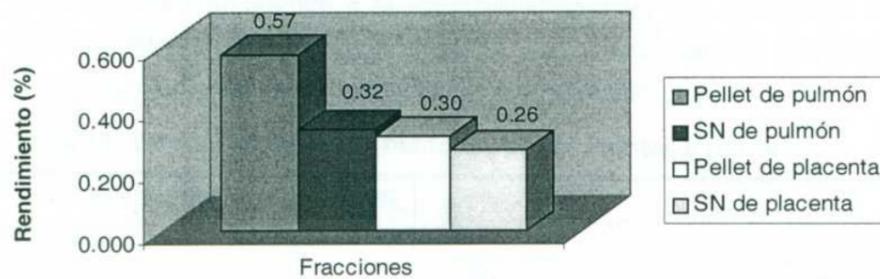


Figura 12: Rendimiento de la extracción final con respecto a masa de tejido inicial

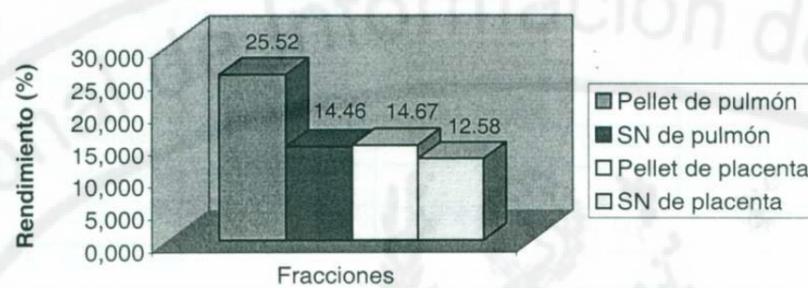


Figura 13: Rendimiento de la extracción final con respecto a fosfolípidos totales iniciales

En el precipitado de pulmón, los valores de fosfolípidos totales superan los de placenta; esto se confirma además, en el análisis de los rendimientos (Figuras 12 y 13), en los cuales los rendimientos de pulmón prácticamente duplican los obtenidos con la placenta. Esta misma conclusión se ratifica cuando se analiza el rendimiento sobre la base de la masa de tejido inicial.

En estudios realizados en placa cromatográfica analizando comparativamente de forma cualitativa la composición de fosfolípidos en el SN y precipitado de pulmón y placenta (Tabla 16) se observó que en ambas fuentes aparecen el mismo número y posición de las manchas, observándose manchas más tenues en el caso del SN acorde con una menor concentración. Estas evidencias reafirman la similitud de la composición de PL de los diferentes compartimentos celulares (intra y extra) del sistema surfactante, existiendo solo pequeñas diferencias en la composición fosfolípídica de las sub-fracciones de ambos compartimentos (Magoon y col., 1983; Van Golde y col., 1988).

Los  $r_f$  de las manchas 1, 2, 3 se corresponden con los  $r_f$  de los patrones comerciales de lisofosfatidilcolina, esfingomielina y fosfatidilcolina, respectivamente (Tabla 16). La

mancha 6 se corresponde a la fosfatidiletanolamina, que aunque no se aplicó, su  $r_f$  es conocido por estudios anteriores realizados por Manzanares y col. (1995), en una matriz similar. La mancha 8 es un componente no identificado.

**Tabla 16: Valores de  $r_f$  de las manchas de las fuentes y patrones.**

Manchas	Patrón	Pulmón		Placenta	
		Precipitado	SN	Precipitado	SN
Lisofosfatidilcolina	0,144	0,144	0,144	0,138	0,138
Esfingomielina	0,188	0,183	0,194	0,183	0,177
Fosfatidilcolina	0,25	0,222	0,238	0,238	0,233
Fosfatidilserina	0,311	-	-	-	-
Fosfatidilinositol	0,327	-	-	-	-
Fosfatidiletanolamina	-	0,505	0,500	0,494	0,494
Fosfatidilglicerol	0,611	-	-	-	-
No identificado		0,700	0,700	0,700	0,700

SN: Sobrenadante

Las manchas correspondientes a los fosfolípidos de fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol no se observaron, debido a que se encontraban en muy bajas concentraciones y la sensibilidad del método no permitió su identificación, trabajos posteriores han demostrado la presencia de los dos primeros, corroborando la semejanza entre los componentes del extracto fosfolípido de pulmón de conejo con el de otras especies vertebradas (Manzanares y col., 1995; y Van Golde, 1988). Debemos resaltar que apareció una concentración alta de lípidos neutros que corrieron con el frente del solvente, así como de PC [3] y SM [2], la LPC [1] se encontró en menor proporción. Estos resultados nos permiten aceptar ambas fuentes por presentar los componentes de interés [1 y 3], ya que ambos constituyen especificaciones de calidad del producto para el cual se desea elaborar el futuro MRI, por constituir el principio activo y componente mayoritario [3], y [1] el producto de degradación al que se le confieren propiedades tóxicas (Grossmann y col., 1999).

Los resultados obtenidos de los precipitados de pulmón y placenta desde el punto de vista cualitativo son similares pues aparecen las mismas manchas. En cuanto a la adquisición es más fácil la obtención del pulmón, pues la placenta necesita de hembras gestadas y además, el precipitado de pulmón tiene mayor rendimiento, por lo que fue escogido el pulmón como fuente más apropiada.

### 3.2.2- Obtención y caracterización del MRI para métodos bioquímicos 3.2.2.1-

#### Obtención de los lotes de MRI

La definición de la tecnología para la elaboración del MRI permitió establecer las operaciones con los parámetros adecuados para lograr la matriz requerida. Las operaciones establecidas fueron:

- Trituración: La variante seleccionada resultó ser en la que se utilizó el equipo Ultratur (WARING COMMERCIAL) a alta velocidad durante 5 minutos, ya que fue la que logró una adecuada ruptura de los tejidos y células con la correspondiente homogenización del material. Esta operación está definida como crítica puesto que del tratamiento del sólido inicial depende la calidad de la posterior lixiviación.
- Lixiviación: Se realizó en un tanque agitado de 5 L de capacidad con impelente de cuatro paletas, se utilizó la solución de cloruro de sodio (150 mM) como solvente. Se lograron los mejores rendimientos a partir de los 60 minutos (Tabla 17).

**Tabla 17: Resultados de los rendimientos a diferentes tiempos de la lixiviación**

Parámetro	Tiempos evaluados (minutos)		
	30	60	120
Rendimiento de Fosfolípidos totales (g/Kg)	13,45 ±0,41	17,21± 0,58	17,32 ±0,35

- Centrifugación: Los resultados de la prueba de espín (Tabla 18) demostraron que se lograba la separación perfecta de ambas fases a velocidades de 4500 r.p.m. durante 30 minutos, en una centrífuga refrigerada de tubos (JOUAN) a 4°C.

**Tabla 18: Caracterización de la suspensión de la prueba de espín**

Fases evaluadas	Velocidad (r.p.m.)	Tiempo (minutos)		
		10	20	30
1	2500	Líquido muy turbio	Líquido turbio	Líquido turbio
2		No se observa	No es estable	No es estable
1	4500	Líquido muy turbio	Líquido turbio	Claro
2		No se observa	No es estable	Compacto

1: Aspecto del sobrenadante

2: Aspecto del precipitado

Con los resultados anteriores se validó la tecnología propuesta (Figura 14), mediante la elaboración de tres lotes candidatos a MRI.

Los resultados de fosfolípidos totales (mg) como control de proceso (Tabla 19) evidenciaron una pérdida considerable después de la primera extracción con respecto a la

PULMONES DE CONEJOS

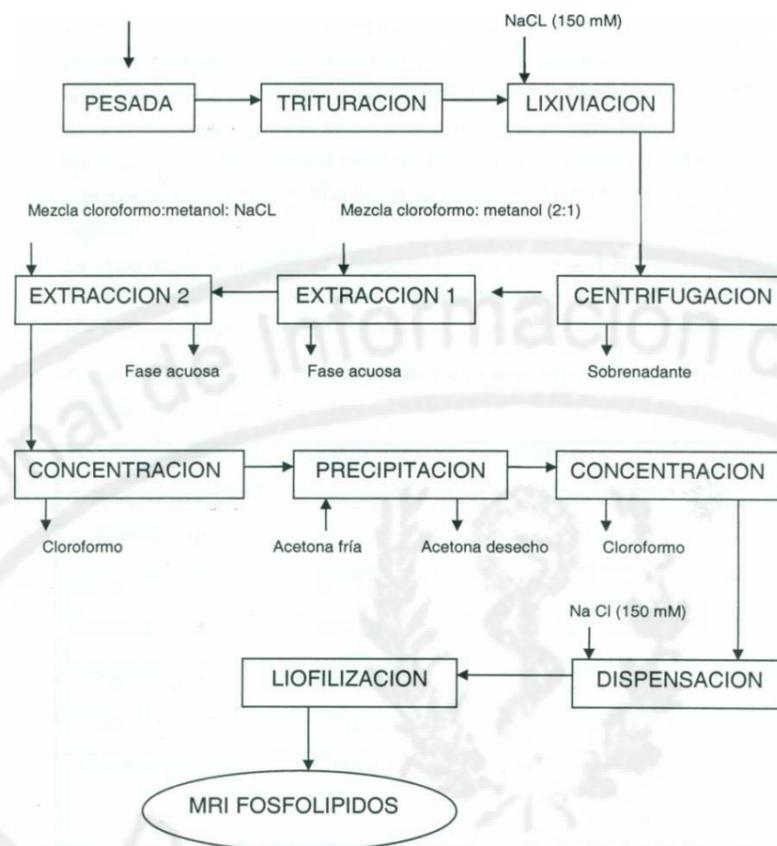


Figura 14: Tecnología de obtención del Material de Referencia Interno (MRI) de fosfolípidos

trituration, esto coincide con los estudios realizados sobre fuentes adecuadas y vías de extracción del precipitado y sobrenadante en nuestro laboratorio, donde siempre las mayores pérdidas ocurren durante los procesos de separación de los fosfolípidos como es en la extracción inicial. Este comportamiento puede ser debido a que el precipitado obtenido de la centrifugación cuando es extraído con la mezcla orgánica forma, en la interfase, una barrera física gruesa formada fundamentalmente por proteínas hidrofílicas desnaturalizadas y precipitadas que puede dificultar la difusión del soluto de interés (fosfolípidos) a la fase orgánica.

La etapa de centrifugación constituye otra de las etapas críticas del proceso, porque en esta ocurre una pérdida de fosfolípidos (aproximadamente un 15 %), estos resultados coinciden con los obtenidos por Manzanares (1995).

**Tabla 19: Rendimiento de fosfolípidos en cada etapa del proceso de elaboración de los lotes de MRI**

<b>Etapas</b>	<b>LOTE I</b>	<b>LOTE II</b>	<b>LOTE III</b>
Masa inicial de pulmones (g)	1065,67	1089,06	2136,20
Extracción 1 (mg)	8576,62	12137,09	11598,84
Extracción 2 (mg)	8239,87	11909,63	10515,2
Precipitación (mg)	3825,20	10422,04	8031,40
Masa final (mg)	3750,00	6643,75	7878,10
Rendimiento (%) (PL iniciales)	44,60	54,74	69,72

### 3.2.2.2- Caracterización de los lotes de MRI

Los resultados de la homogeneidad del llenado (Tabla 20), demuestran que el coeficiente de variación de los lotes están por debajo del límite establecido (1%) hallado por Zanelli (1982), lo que expresa una adecuada homogeneidad de la operación de llenado al incorporar las recomendaciones de estudios anteriores que demostraron la necesidad de agitación constante a 37 °C durante la dispensación, como vía para garantizar la homogeneidad de la suspensión.

Tabla 20: Homogeneidad de los lotes de MRI candidatos

Atendiendo a	Parámetro	LOTE 1	LOTE II	LOTE III
Homogeneidad del llenado (mL)	X	0,9993	0,9898	0,9974
	DS	0,0068	0,0064	0,0027
	CV	0,6715	0,5349	0,2746
Homogeneidad por determinación de fosfolípidos totales	X	24,96	25,10	24,78
	Intervalo de confianza	24,54- 25,37	24,46-25,74	24,49-25,07

Por otra parte, la homogeneidad del lote por determinación de fosfolípidos totales fue comprobada ya que se demostró que la varianza entre los diez frascos de cada lote fue menor que la varianza dentro de cada uno de los frascos, lo que permitió determinar la incertidumbre del valor asociado a las muestras y se calculó el intervalo de confianza para cada lote (NC- ISO Guía 35, 1998).

Los valores de referencia para fosfolípidos totales son utilizados en el control interno de la calidad del método de fosfolípidos totales por medio de la confección de gráficos de control utilizados regularmente para demostrar la estabilidad que presentan los resultados del método de ensayo (ISO 5725-2, 1994).

La humedad residual, en todos los lotes, se mantuvo por debajo del indicador establecido (< 2 %), garantizando, de esta forma, condiciones de humedad mínima que evitan la degradación hidrolítica y microbiológica del producto.

En la determinación del límite microbiano, se demostró la ausencia de microorganismos patógenos que pudieran afectar a los analistas que utilizan el producto.

En las placas cromatográficas se identificaron correctamente la composición de los fosfolípidos de los materiales candidatos (Tabla 21) coincidiendo con los valores de los  $r_f$  de los patrones comerciales utilizados. Los tres lotes mostraron similar perfil cromatográfico en cuanto a número y posición de las manchas.

Los  $r_f$  de las manchas 1 a la 6 se corresponden con las manchas del SURFACEN (Manzanares y col., 1995). La mancha 7, fosfatidilglicerol, es un componente del surfactante que no se observó, esto puede ser, debido a la existencia de bajas concentraciones (trazas) por lo que el sistema analítico no tiene sensibilidad para su detección, o que no se encuentra en el material de referencia. Las manchas 8 y 9 son dos componentes no identificados que migran cercana al frente del solvente, por lo que tienen características apolares (lípidos o ácidos grasos de altos pesos moleculares), estos no se hallan en el

surfactante por lo que no son de interés y su eliminación puede ser objeto de mejoramiento futuro del MRI.

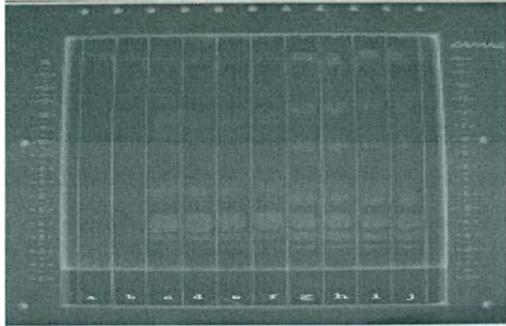
Los resultados de la caracterización cuantitativa de cada uno de los fosfolípidos presentes en el MRI (Tabla 22), mostraron que la PC es el componente mayoritario (mayor de un 30 %), seguido por la SM (mayor del 10 %), los restantes fosfolípidos se encuentran en cantidades apreciables, lo que garantiza una proporción adecuada de los diferentes compuestos, para los fines analíticos propuestos.

Debemos señalar que la cuantificación de los lotes se realizó en placas de alto poder resolutivo, por lo que se logró una buena separación de todos los fosfolípidos y se realizó la cuantificación de todas las manchas, además los resultados fueron reproducibles en todas las placas.

**Tabla 21: Valores de  $r$ , de los fosfolípidos que componen al MRI y de los patrones comerciales**

No	Manchas	MRC (SIGMA)	LOTE I	LOTE II	LOTE III
1	Lisofosfatidilcolina	0,142-0,159	0,158	0,154	0,156
2	Esfingomielina	0,188-0,200	0,206	0,200	0,200
3	Fosfatidilcolina	0,250-0,269	0,264	0,268	0,260
4	Fosfatidilserina	0,311-0,355	0,358	0,354	0,350
5	Fosfatidilinositol	0,343-0,420	0,418	0,411	0,415
6	Fosfatidiletanolamina	0,583-0,606	0,606	0,583	0,600
7	Fosfatidilglicerol	0,611-0,695	-	-	-
8	No identificado	-	0,743	0,759	0,750
9	No identificado	-	0,926	0,918	0,910

En el caso de la LPC y la SM, sus porcentajes están por encima de los reportados para el surfactante (Manzanares y col., 1995), donde estos componentes aparecen como manchas débiles y por lo tanto al encontrarse en mayor proporción en el MRI permite identificados mejor, una aplicación útil constituirá facilitar la identificación de la LPC en la muestra como principal contaminante del producto.



**Figura 15: Resultados cualitativos de la separación de fosfolípidos por CCD (a,b: Blancos c,d,e,f: SURFACEN g,h,i,j: MRI de fosfolípidos**

**Tabla 22: Resultados del porcentaje de cada uno de los fosfolípidos presentes en el MRI**

Componente	LOTE 1 (%)	LOTE II (%)	LOTE III (%)	SURFACEN
LPC	3,38	2,18	3,85	0,6- 1,5
SM •	16,72	20,92	18,56	3,6- 5,1
PC	44,4	38,50	41,22	65,0-71,4
PS »	14,15	8,36	10,45	1,1-1,8
PI \	4,02	2,26	3,16	11,4- 13,3
PE	6,83	10,35	7,21	3,7- 4,8
PG			-	5.4- 7.7
NI	1,76	1,53	0,97	0,1-2,2
NI	0,96	0,82	0,78	

*NI: No identificados*

Los resultados del análisis de cinco muestras de cada lote mediante el método analítico que permite cuantificar la cantidad de fosfolípidos disaturados con respecto al total de fosfolípidos (Tabla 23), mostraron que el porcentaje de este analito es mayor del 30 %, e inferior a lo reportado para el SURFACEN.

**Tabla 23: Resultados del porcentaje de fosfolípidos disaturados de los lotes de MRI**

LOTE	% DPPC / PL		X (%)	DS
I	1	37,88	36,72	1,08
	2	35,89		
	3	37,48		
	4	35,62		
	5	35,70		
II	1	36,49	39,27	3,02
	2	40,30		
	3	37,63		
	4	37,86		
	5	44,08		
III	1	38,23	38,28	0,88
	2	39,15		
	3	37,44		
	4	39,20		
	5	37,40		

Estos niveles de DPPC < 40 % pueden ser debido a que el MRI se obtiene de homogenato de pulmón, por lo que presenta mayor concentración de fosfolípidos de membranas, lo que disminuye la concentración relativa de los fosfolípidos disaturados. Estos resultados son similares a los obtenidos por Robertson y Curstedt, (1988), quienes patentaron un surfactante pulmonar natural a partir de pulmones triturados con niveles más bajos de DPPC que lo requerido para una buena actividad surfactante.

El seguimiento en el tiempo de los diferentes indicadores de estabilidad del producto mostró que los tres lotes conservan las propiedades de interés durante un período de 24 meses (Tablas 24, 25 y 26), debido a que los valores, para cada indicador de estabilidad evaluado, se encuentran dentro de los intervalos de aceptación. Estos resultados fueron corroborado estadísticamente tras aplicar la prueba t (Sistema SAS, Versión 8.2, 2001),

donde se evidenciaron significaciones puntuales que están asociadas a la variabilidad de los métodos analíticos fundamentalmente.

**Tabla 24: Resultados de la estabilidad del lote I**

Indicadores de estabilidad	Frecuencia de evaluación (meses)			
	t <sub>0</sub>	12	18	24
Fosfolípidos totales	24,96 ± 0,58	25,03 ± 0,23	24,82 ± 0,35	24,91 ± 0,28
LPC/ PL totales	3,38 ± 0,51	3,46 ± 0,29	3,55 ± 0,24	3,81 ± 0,54
PC/PL totales	44,40 ± 3,83	44,22 ± 1,53	44,58 ± 1,24	43,10 ± 3,07
DPPC/ PL totales	36,72 ± 1,08	35,40 ± 1,14	35,21 ± 2,82	33,44 ± 2,08 **

*p* < 0,05 (95 %) Significativo

PL totales: Concentración de fosfolípidos totales

LPC/ PL totales: Concentración relativa de lisofosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

PC/PL totales: Concentración relativa de fosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

DPPC/ PL totales: Concentración relativa de dipalmitoilfosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

**Tabla 25: Resultados de la estabilidad del lote II**

Indicadores de estabilidad	Frecuencia de evaluación (meses)			
	t <sub>0</sub>	12	18	24
Fosfolípidos totales	25,10 ± 0,89	24,94 ± 0,23	24,71 ± 0,40	24,98 ± 0,40
LPC/ PL totales	2,18 ± 0,20	2,33 ± 0,48	2,41 ± 0,44	2,95 ± 0,14 **
PC/PL totales	38,50 ± 1,94	37,35 ± 2,74	37,50 ± 2,28	37,10 ± 1,58
DPPC/ PL totales	39,27 ± 3,03	38,45 ± 4,96	39,10 ± 4,38	38,09 ± 2,74

\*\*; *p* < 0,05 (95 %) Significativo

PL totales: Concentración de fosfolípidos totales

LPC/ PL totales: Concentración relativa de lisofosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

PC/PL totales: Concentración relativa de fosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

DPPC/ PL totales: Concentración relativa de dipalmitoilfosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

Tabla 26: Resultados de la estabilidad del lote III

Indicadores de estabilidad	Frecuencia de evaluación (meses)			
	to	12	18	24
Fosfolípidos totales	24,78 ± 0,41	24,55 ± 0,23	24,71 ± 0,36	24,83 ± 0,49 *
LPC/ PL totales	3,85 ± 1,16	3,91 ± 0,27	4,05 ± 0,10	4,13 ± 0,08
PC/PL totales	41,22 ± 2,83	41,35 ± 1,06	41,13 ± 1,45	40,82 ± 0,10
DPPC/ PL totales	38,28 ± 0,88	38,12 ± 1,91	37,72 ± 1,71	36,93 ± 3,20

\*:  $p < 0,1$  (90 %) Significativo

PL totales: Concentración de fosfolípidos totales

LPC/ PL totales: Concentración relativa de lisofosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

PC/PL totales: Concentración relativa de fosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

DPPC/ PL totales: Concentración relativa de dipalmitoilfosfatidilcolina con respecto a fosfolípidos totales

Una vez caracterizados los tres lotes de MRI, obtenidos por la metodología propuesta, se establecieron indicadores de calidad para este producto, lo que permitirá la evaluación de los futuros lotes.

**Indicadores de calidad del MRI de fosfolípidos para fines analíticos:**Descripción: liofilizado de color blanco hueso, dispensado en frascos de 2 mL, sellado a vacío.Conservación: Temperatura de refrigeración (2 a 4 °C).Características bioquímicas:

Fosfolípidos totales.....25 mg ± 5 %

Lisofosfatidilcolina/ PL..... &lt; 5 %

Esfingomielina/ PL..... &gt; 10 %

Fosfatidilcolina/ PL .....&gt; 30 %

Fosfatidilcolina disaturada/ PL .....&gt; 30 %

Límite microbiano .....Libre de microorganismos patógenos.

### 3.2.3- Elaboración y caracterización del MRIB

#### 3.2.3.1- Obtención de los lotes de MRIB

El diseño del flujo para la obtención del MRIB (Figura 16) tuvo como elemento indispensable la obtención de una matriz fosfolípida donde el elemento mayoritario fuera la DPPC (> 40 %), por lo que fue necesario definir los parámetros adecuados de las operaciones (trituration, lixiviación y centrifugaciones), como pasos iniciales para la extracción de los componentes de interés.

A diferencia del flujo para la obtención del MRI anterior donde se procedía a una trituración completa del material, en este se realiza la trituración del material mediante molido, garantizando la extracción mínima de fosfolípidos de membrana en el paso de lixiviación. Igualmente fue necesario realizar modificaciones en la centrifugación, que en este caso conllevó a cambio del tipo de centrífuga (Centrífuga de discos) y a la introducción de dos etapas de centrifugación en diferentes condiciones: 1<sup>era</sup> Centrifugación para la eliminación de la mayor contaminación de residuos sanguíneos y debris celular, y la 2<sup>da</sup> Centrifugación con la finalidad de concentrar los fosfolípidos.

Los resultados de los rendimientos de fosfolípidos totales de las 10 corridas en la etapa de lixiviación (Tabla 27) demostraron consistencia en la operación. Por otra parte, los buenos rendimientos a pesar de que el tiempo de lixiviación es corto (1 h), se debe a que el surfactante pulmonar es una sustancia que se excreta al espacio alveolar después de ser producida en los neumocitos tipo II (Clements y Avery, 1998; Haller y col., 1998), por lo que el surfactante atraviesa la pared celular y migra con facilidad al medio acuoso salino.

**Tabla 27: Rendimientos de fosfolípidos totales de la etapa de lixiviación**

Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8	8	10	X
Rend.	16,5	14,7	12,6	16,4	16,2	16,0	13,6	17,6	19,4	15,8	15,89 ± 1,93

*Rend: Rendimiento de fosfolípidos totales (g/kg de pulmón)*

Los resultados de los rendimientos de las 10 corridas en la etapa de centrifugación 1 (Tabla 28) demostraron una variabilidad aceptable en esta operación crítica, responsable de la purificación primaria del extracto acuoso inicial favorecido con el tiempo de descarga cada 20 minutos, lo que demostró su consistencia.

PULMONES DE CONEJOS

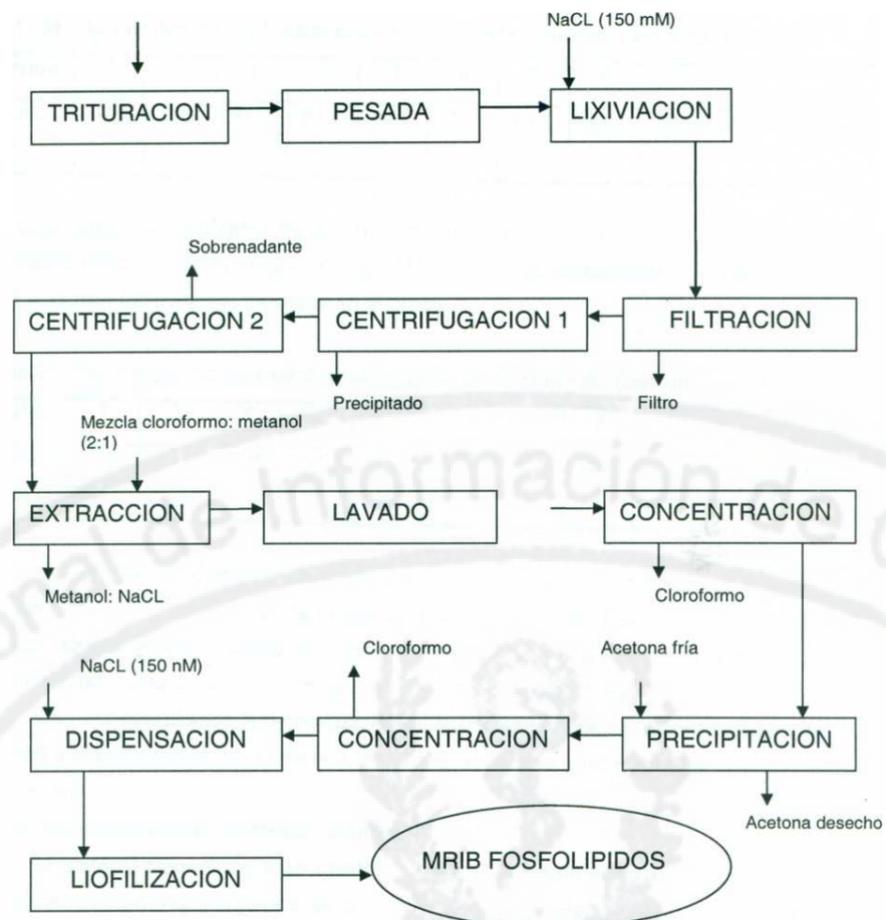


Figura 16: Tecnología de obtención del Material de Referencia Interno Biológico (MRIB)

**Tabla 28: Rendimientos de fosfolípidos totales de la etapa de Centrifugación 1**

Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8	8	10	
Rend. (%)	67,0	72,7	81,2	81,6	54,5	69,8	74,4	62,1	79,9	82,1	72,5 ± 9,3

Por otra parte, los resultados de las 10 corridas de la centrifugación 2 (Tabla 29) ratificó resultados históricos en la producción de SURFACEN que demuestran que esta es la etapa donde ocurren las mayores pérdidas en el proceso.

**Tabla 29: Rendimientos de fosfolípidos totales de la etapa de Centrifugación 2**

Corrida	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Rend. (%)	5,7	5,7	5,9	6,2	8,0	8,5	3,8	4,0	3,5	3,8	5,5 ± 1,8

El resto de las operaciones evidenciaron rendimientos aceptables comparables con los obtenidos históricamente en la producción de surfactantes. Estas etapas no involucran pérdidas considerables de producto y permiten la purificación de la matriz y la eliminación de contaminantes como grasas, lípidos neutros y proteínas sanguíneas.

Una vez establecida la tecnología de obtención del candidato a MRIB (Figura 16), se procedió a la elaboración de, al menos, dos lotes con vistas a demostrar la reproducibilidad del proceso.

### 3.2.3.2- Caracterización del MRIB candidato

La caracterización de este MRIB conllevó a la determinación de un conjunto de indicadores imprescindibles para evaluar la consistencia del proceso de obtención, así como la determinación de la propiedad de interés (actividad surfactante en el modelo de gazapos inmaduros).

Los resultados de la caracterización (Tabla 30) demuestran una mayor similitud cualitativa y cuantitativa entre este MRIB y el SURFACEN, aunque debe señalarse que se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en los niveles de LPC entre los lotes de MRIB, y entre el lote 1 de MRIB y el SURFACEN. Estos resultados aunque no afectaron la actividad biológica, son importantes tenerlos en cuenta en los estudios de estabilidad de este MRIB, puesto que está demostrado su efecto tóxico a dosis superiores a los 10 mg/ Kg de peso por provocar la inactivación del surfactante y aumentar la

permeabilidad pulmonar, por lo que este es un producto de degradación poco deseado en las preparaciones de surfactantes pulmonares (Travieso y Fraga, 2002).

**Tabla 30: Caracterización bioquímica del MRIB**

No.	Propiedad (%)	LOTE 1	LOTE 2	SURFACEN
1	Fosfatidilcolina/ PL totales	66,59- 69,03	61,36- 63,42	65,00 - 71,40
2	Lisofosfatidilcolina/ PL totales	2,65- 4,29	0,46-1,28	0,6- 1,5
3	Dipalmitoilfosfatidilcolina/PL totales	51,43-57, 19	48,55 -51,09	44,3- 46,8
4	Proteínas/ PL totales	0,59- 0,63	0,77- 0,79	0,5- 1,3

Evaluación de la propiedad de interés (actividad biológica).

La evaluación de la propiedad de interés se realizó tomando aleatoriamente tres muestras de cada lote a las que se les midió la actividad biológica por el Método de Gazapos inmaduros en diferentes gazapos de diferentes conejas, para lograr la mayor variabilidad de las condiciones de los ensayos en nuestras condiciones prácticas posibles, para obtener resultados preliminares que indiquen la posibilidad real de uso de este MRIB como control positivo de este método biológico.

Los resultados (Figuras 17 y 18) muestran que los fetos tratados con el MRIB tienen un comportamiento superior al control. Esto se aprecia por la disminución de la presión de apertura de los pulmones, o sea, de la presión necesaria para el inicio de la entrada de aire al pulmón. La diferencia entre los tratados y los controles se debe a que en estos últimos hay una resistencia a la expansión debido a una alta tensión superficial entre el aire y la película del fluido que revisten los alvéolos.

Los controles no logran llegar a expandir los pulmones, mientras que los grupos de animales tratados sí lo consiguen. La capacidad del MRIB de disminuir la tensión superficial y de permitir la entrada de aire a los pulmones durante la inflación se muestra cuando se alcanzan elevados volúmenes a una presión de 25 cm de agua.

Se plantea que este volumen máximo ( $V_{m\acute{a}x}$ ) de expansión en los animales tratados puede llegar a ser dos y medias veces el del control, por lo que se aceptan valores de  $V_{m\acute{a}x}$  mayores de 30 mL/ Kg para fetos tratados contra valores de  $V_{m\acute{a}x} = 0,4$  para los controles (Jobe, 1993). Los resultados de los dos lotes de MRIB (Tabla 31) demuestran una buena actividad surfactante.

Tabla 31: Indicadores de la actividad surfactante de los lotes de MRIB

PARAMETRO	INDICADOR	LOTE I	LOTE II
$V_{m\acute{a}x}$ (mL/ kg)	>30	98,6	76,37
$V_5$ (mL/ kg)	>0.4	0,56	0,61

$V_{m\acute{a}x}$ : Volumen máximo que avanza el agua en la pipeta, dividido entre el peso en gramos del gazapo y multiplicando por 1000, corresponde al volumen expandido por kg de peso

$V_5$ : Relación entre el volumen a presión 5 cm de agua durante la deflacción y el volumen máximo que avanza el agua en las pipetas

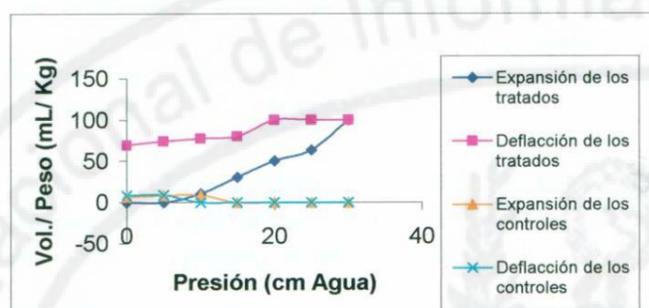


Figura 17: Curva Presión- Volumen en conejos prematuros del lote 1

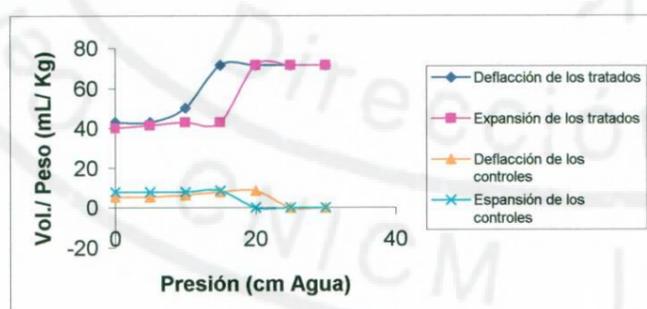


Figura 18: Curva Presión- Volumen en conejos prematuros del lote 2

Estos resultados son similares a los informados para el SURFACEN y superiores a otros publicados para surfactantes como SURVANTA y EXOSURF, en los que es necesario

elegir la presión hasta 30 cm de agua para alcanzar valores de volúmenes máximos de expansión similares a los obtenidos con este candidato a MRIB.

La relación entre el volumen a los 5 cm de agua durante la deflación y el volumen alcanzado a la presión máxima refleja la estabilidad del pulmón durante la deflación. Se plantea que en los surfactantes de elevada calidad esta relación debe ser mayor de 0,4 mL/ Kg (Notter y Shapiro, 1989). Los valores alcanzados por el producto objeto de análisis, en ambos lotes, indican una buena estabilidad pulmonar durante la deflación.

**CONCLUSIONES PARCIALES:**

- Se seleccionó el pulmón de conejo, como fuente más factible técnica y económicamente, por presentar los componentes de interés, tener más rendimiento, ser más fácil su adquisición, y gastar menos volúmenes de solventes orgánicos para su procesamiento.
- Se estableció un procedimiento para la obtención del Material de Referencia Interno de fosfolípidos, logrando reproducir tres lotes que cumplen los requisitos exigidos para este tipo de producto con fines analíticos.
- Se logró un procedimiento para la obtención del Material de Referencia Interno biológico (MRIB) de fosfolípidos, logrando reproducir dos lotes que mostraron una actividad surfactante similar en el modelo estudiado, siendo estos resultados preliminares promisorios para la obtención de un MRIB nuevo para control interno de este ensayo.



# ***CAPITULO 4***

#### **4. ESTUDIO DE FACTIBILIDAD ECONOMICA**

El estudio de evaluación económica de una investigación es fundamental ya que proporciona elementos sobre la factibilidad de la misma, lo que constituye un elemento decisivo al valorar las nuevas tecnologías (Ciño y De Armas, 1996).

Es por ello que el conocimiento de los costos y de los beneficios vinculados a los proyectos de investigación, y un manejo adecuado de la información y de los datos económicos, permitirán desarrollar una planificación efectiva de las tareas investigativas, el control de los recursos invertidos y determinar el resultado económico esperado por la innovación tecnológica que se desee introducir.

Se impone, en el presente trabajo, la necesidad de realizar una evaluación económica preliminar para la selección de la alternativa más factible técnica y económicamente, por lo que estableceremos una comparación económica entre el costo de producción de los lotes de MRI a escala de laboratorio, y el costo de adquisición de un juego de patrones comerciales de la casa SIGMA; igualmente se comparará la factibilidad entre el método de CCD y el nuevo sistema de análisis de fosfolípidos por CLAR, este segundo como método alternativo más simple y rápido entre otras ventajas. Por último, debido a que no existe en el mercado disponibilidad de MRC para el método biológico de evaluación de actividad surfactante, se propone la obtención del MRIB como alternativa al desvío de medicamento surfactante que tiene, además de altos costos, una demanda importante e insatisfecha para salvar vidas de neonatos en Cuba.

##### **4.1- Costo de producción de un lote de MRI de fosfolípidos (265 bulbos)**

Teniendo en cuenta que el laboratorio en el que se realizó la elaboración de los lotes de MRI presenta la infraestructura y equipamiento necesario para llevar a cabo la ejecución de la misma, el cual tiene implantado las Buenas Prácticas de Laboratorio, y los equipos necesarios están disponibles, por lo que no fue necesario realizar ninguna inversión previa. Haciendo esta aclaración es necesario, entonces, ejecutar el análisis económico de la tecnología propuesta, con vistas a comparar la posibilidad de obtener este MRI en el laboratorio con la alternativa posible que resulta en comprar MRC de la SIGMA, que es la firma que lo oferta de la calidad requerida, y a un precio más barato. El costo de adquisición de estos MRC al precio real de venta (740,20 USD por cada juego de patrones puros).

Se considera que el costo de producción de un lote estándar (265 bulbos) es de 512,96 pesos y 154,15 USD como se aprecia en la Tabla 32. De este material de referencia 24 bulbos equivalen a un juego comercial.

**Tabla 32: Costo de producción de un lote representativo de MRI**

Elemento	Moneda nacional		USD	
	265 bulbos	24 bulbos	265 bulbos	24 bulbos
Materias primas y materiales	-	-	68,72	6,22
Energía	108,94	10,28	-	-
Aseguramiento de la calidad	146,16	146,16	85,42	85,42
Servicios externos	17,11	17,11	-	-
Salarios	152,96	13,85	-	-
Costos directos	325,18	187,41	154,15	91,65
Costos indirectos	187,78	17,72	-	-
Costos de producción	512,96	205,12	154,15	91,65

En los anexos (2-13), se muestran todos los insumos, fuerza de trabajo (salarios), y explotación de los equipos requeridos para la producción de un lote representativo.

Se ejecutó una comparación entre el costo de producción de 24 bulbos de MRI, que es el equivalente a un juego de MRC, con el costo de la adquisición de MRC puros de la SIGMA, lo que demostró que la obtención de este MRI en el laboratorio es más factible económicamente porque involucra un ahorro de 648, 55 USD por cada juego comercial que se evite comprar.

No fue posible el cálculo de otros indicadores económicos como el TIR y el VAN, ya que no se tiene previsto la venta de este MRI, ya que su producción se realizó sólo para uso interno del laboratorio de control de calidad, por lo que no se pueden estimar los posibles precios de venta, entre otros datos imprescindibles para conocer los mismos.

La factibilidad técnica y económica del candidato a MRIB está avalada por la demostración del posible uso para estos fines por la excelente actividad demostrada en el modelo y método para el cual se diseñó, y a la falta de disponibilidad en el mercado de un MRC para evaluar este tipo de actividad farmacológica. La alternativa, en estos casos, es la toma de un lote del producto farmacéutico, previamente caracterizado y demostrado su actividad y su

comportamiento en el modelo, con una n definida estadísticamente, variante que en este caso particular es impracticable.

Con respecto al análisis de factibilidad del nuevo sistema de análisis de fosfolípidos por CLAR, en la Tabla 33 se detallan ventajas de este método que avalan su superioridad y lo hacen atractivo para los ensayos de rutina.

**Tabla 33: Resultados que evidencian la factibilidad del método de CLAR con respecto al método de CCD**

PARAMETRO	DESVENTAJAS CCD	VENTAJAS HPLC
Tiempo de análisis	3 días	8 h
Gasto de reactivos	Normal	Normal
Contaminación de muestras	Muy probable	Poco probable
Complejidad del método	Muy complejo (aplicación, raspado, tto y cuantificación espectrofotométrica)	Simple (Pretratamiento y aplicación)
Precisión	Gran variabilidad por factores ambientales	Precisión adecuada
Uso de sistemas auxiliares	Agua	No
Uso de otros equipos	Baño de María Plancha de calentamiento Espectrofotómetro Centrífuga Refrigerada	Sonicador
Uso de servicios internos	Fregado (Uso de gran cantidad de cristalería que debe ser tratada))	No
Medio ambiente	Sistema abierto que conlleva a la manipulación de sustancias tóxicas por inhalación como el cloroformo, I <sub>2</sub> , etc.	Sistema cerrado donde se sustituyen estos por otros menos tóxicos

Además del impacto económico de las tecnologías y del nuevo sistema analítico propuestos, debemos añadir que aunque los procesos de validación de los métodos de ensayos son costosos (costos de prevención), estos van a disminuir los costos de fallos, ya que al tener los ensayos bajo control, es decir, los indicadores de calidad de los mismos bien establecidos, el analista puede decidir si el ensayo cumple con sus criterios técnicos, por lo que se evitan las repuebas innecesarias que multiplican los costos de calidad, así como el rechazo de productos aptos o la liberación de productos no conformes. De esta manera la validación de los ensayos permite la disminución de los costos totales de calidad.

Estos estudios contribuyen, además, a la aceptación del producto al aumentar la confianza que se le brinda al cliente; a la disminución de las quejas y reclamaciones por no

cumplimiento de las especificaciones; y coadyuvan al acatamiento de las regulaciones internacionales que facilitan los trámites de registro y comercialización.



# DISCUSION GENERAL



### Discusión general

Los resultados del presente trabajo están encaminados a establecer elementos que posibilitan el control interno de los ensayos de evaluación de un medicamento con requisitos similares a los de un inyectable, por lo que es obligatorio que estos ofrezcan resultados confiables que permitan la liberación de un producto estable, seguro y efectivo.

Se abordó el control interno, mediante el establecimiento de indicadores de calidad de los ensayos obtenidos mediante procesos de validaciones prospectivas y retrospectivas (Fernández, 1996), que serán chequeados día a día, para determinar la conformidad técnica de los ensayos, así como el empleo de Materiales de Referencia Internos para métodos bioquímicos (MRI) y biológico (MRIB), caracterizados y contrastados contra patrones puros de cada uno de los componentes fosfolípidicos, que evaluará, en el caso del MRI de fosfolípidos, la exactitud y precisión diaria de los métodos, y en el caso del MRIB se utilizará como control positivo en el ensayo de evaluación de la actividad biológica en gazapos inmaduros, coincidiendo con Ohman (1997) al expresar que estos controles internos dependen del tipo de método de ensayo, y con Griepink (1990) quien señalaba el importante papel de estos materiales de control en la verificación de la trazabilidad de la calibración, verificación de la exactitud y control de la calidad diaria a través del uso del control estadístico.

La tecnología diseñada para la elaboración del MRI de fosfolípidos, a partir de pulmones de conejos, permitió la obtención de un producto cuya composición bioquímica cualitativa es similar a la del resto de los surfactantes naturales (Fujiwara y col., 1982; Robertson y Curstedt, 1988; Manzanares y col., 1997), diferenciado fundamentalmente en la ausencia del fosfatidilglicerol, y en las proporciones de los diferentes componentes, lo cual posibilita que este MRI pueda ser utilizado en el control interno de los ensayos de evaluación del surfactante pulmonar natural *SURFACEN*.

El MRI se obtuvo mediante el procesamiento de pulmones enteros (Fujiwara y col., 1982; Robertson y Curstedt, 1988) lo que explica un contenido relativamente superior de fosfolípidos de membrana como la esfingomielina, la fosfatidilserina, el fosfatidilinositol, y la fosfatidiletanolamina, con respecto a los surfactantes obtenidos de lavado pulmonar (Manzanares y col., 1997), en los cuales estos metabolitos están disminuidos para dar una concentración relativa de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) mayor, y por consiguiente una alta actividad tensoactiva. Además el MRI presenta un alto contenido de lípidos neutros que

### Discusión general

corren con el frente del solvente en el método de CCD, los cuales también inhiben su actividad biofísica (Wang y col., 1995).

Durante el proceso de obtención del MRI se monitorearon las concentraciones de fosfolípidos totales (Zilversmith, 1950) en las diferentes etapas para realizar los ajustes de concentraciones en las operaciones críticas y garantizar la reproducibilidad del mismo.

Debemos señalar que en la literatura especializada consultada no existen referencias del estudio de órganos (pulmón y placenta) de esta especie, lo que amplía el conocimiento existente sobre estos compuestos y su distribución en los diferentes órganos. Además, este trabajo nos permitió corroborar el supuesto previsto a partir de lo expresado por Cockshutt y Possmayer (1992) y Daniels y col. (1995) acerca de que las características fundamentales de la composición bioquímica del surfactante pulmonar están altamente conservadas en diferentes especies (hombre, cerdo, rata, oveja, pollo) y que difieren de la composición bioquímica de otros órganos; al demostrar, con los resultados obtenidos que la composición cualitativa de los órganos estudiados es similar a la del pulmón porcino, diferenciándose en los resultados cuantitativos. Es importante apuntar que los métodos de extracción y purificación son fundamentales puesto que en este caso, al partir de homogenato de los órganos seguido de lixiviación y extracciones sucesivas, se obtienen un número de compuestos mayores, incluso compuestos aún no identificados, que los obtenidos en el *SURFACEN* que es obtenido de lavado pulmonar, por lo que supuestos compuestos minoritarios del surfactante pulmonar del conejo, no se encuentran en cantidades cuantificables, tal es el caso del fosfatidilglicerol (PG). La ausencia del PG en el MRI abre nuevas perspectivas de investigación, teniendo en cuenta la importancia que en los últimos años se le ha conferido a este compuesto en la maduración fetal pulmonar, y en su función de facilitar la rápida adsorción y distribución de la DPPC en la interfase aire- líquido donde realiza su función (Lopatko y col., 1998).

Por otra parte, la práctica más común para la elaboración de un MRIB en la industria farmacéutica, es el empleo de un lote de producto obtenido en las condiciones óptimas y que ha sido caracterizado en el modelo biológico, y se conoce su homogeneidad y estabilidad.

En nuestro caso, sin embargo, la poca disponibilidad del medicamento, conllevó, a explorar nuevas vías y fuentes alternativas para la obtención de una matriz de fosfolípidos activas en el modelo de gazapos inmaduros.

### Discusión general

El tamaño del órgano seleccionado (pulmón de conejo), fue a su vez otra limitación para la utilización del procedimiento convencional de lavado pulmonar utilizado para la obtención del SURFACEN (Manzanares y col., 1997), por lo que fue necesario buscar la mejor variante para realizar la lixiviación del material de partida, identificándose este como un punto crítico para la obtención de la matriz requerida que presentara el mínimo de contaminantes lipídicos y proteicos internos de las membranas y propiciar la extracción sólo de los componentes del surfactante pulmonar. Este procedimiento inevitablemente involucra la presencia de componentes sanguíneos, por lo que el proceso de purificación posterior es más riguroso que la metodología convencional (Manzanares y col., 1997), conllevando etapas de centrifugación, extracciones líquido- líquido, y precipitación (Díaz, 1999).

La caracterización ideal de este candidato a MRIB debería ser a través del uso de un método específico (estudio interlaboratorios) que permite obtener sólo valores propios al método específico evaluado (NC-ISO Guías 34 y 35, 1998), pero en nuestras condiciones resulta impracticable, en estos momentos, por la no posibilidad de ejecución de este método biológico en otros laboratorios del país, y la necesidad de recurrir entonces a un estudio interlaboratorios internacional, por lo que se utilizó otra variante técnicamente válida sugerida en esta referencia, que consistió en el empleo de un método único definitivo, por duplicado, por una organización única (NC-ISO Guía 34, 1998).

La caracterización bioquímica de los dos lotes candidatos a MRIB producidos, a diferencia de la caracterización del MRI, sólo conllevó la medición de aquellos compuestos o grupo de compuestos que están relacionados o coadyuvan a la actividad, y la propiedad de interés en este caso evaluada fue la actividad biológica en el modelo para el cual está previsto su uso, siguiendo recomendaciones de la NC-ISO Guía 34 que brinda varias propuestas para la caracterización de Materiales de Referencia, y la ISO 10993 que en su parte 12 regula la preparación de muestras y materiales de referencias para pruebas biológicas de dispositivos médicos, los cuales consideramos pueden ser tomados en cuenta en nuestro campo (ISO 10993-12, 2002).

El uso único propuesto para este MRIB es como material de control (positivo) para demostrar la capacidad del método biológico de gazapos inmaduros de rendir una respuesta reproducible, no se recomienda para otras pruebas que midan este tipo de actividad en los que este candidato a MRIB no se ha caracterizado.

Por otra parte, coincidimos con Rodríguez y col. (2003) que señala la necesidad de búsqueda de métodos analíticos simples, rápidos, poco costosos, confiables y validados, como un objetivo fundamental de un laboratorio de control de calidad. En este sentido la nueva propuesta analítica para la separación y cuantificación de fosfolípidos por CLAR, pretende introducir una tecnología más ventajosa técnica y prácticamente. A pesar de que el análisis de estos compuestos por CLAR se lleva a cabo desde hace más de dos décadas, aún no es la tecnología más utilizada en el control de calidad de medicamentos surfactantes pulmonares. En este campo se ha publicado el uso de un sistema que permite la separación y cuantificación de la DPPC y el ácido palmítico, que representan el principio activo y un producto de degradación de este tipo de medicamento (Gross y col., 2000), e igualmente desde hace algunos años, evaluadores de surfactantes informaron un nuevo sistema de análisis de los principios activos (fosfatidilcolina y su fracción disaturada) de un surfactante pulmonar (Scarim y col., 1989).

La separación de fosfolípidos por CLAR se ha dividido en dependencia de los detectores empleados, los cuales han constituido la principal limitante para el logro de sistemas efectivos. Dentro de estos tipos de detectores los más utilizados son los espectrofotométricos a bajas longitudes de onda en la región ultravioleta (200- 206 nm) con desventajas para la selección de los solventes transparentes; los de dispersión y refracción de luz; así como los detectores de masa que constituyen los más reconocidos universalmente para este tipo de separación. Esta situación, unida a la complejidad de las muestras que generalmente están formado por mezclas de fosfolípidos con propiedades físico- químicas similares, dificulta la estandarización de los sistemas analíticos, aunque una vez logrado el sistema de separación y cuantificación óptimo las ventajas de esta tecnología son muy superiores con respecto a otros sistemas cromatográficos (Christie, 1992).

Con respecto a los métodos analíticos que se utilizan en el control de la calidad del *SURFACEN*, y que de hecho, fueron utilizados para la caracterización de este MRI, sus validaciones permitieron un mayor conocimiento de los indicadores de calidad de dichos ensayos, para lo cual se partió de lo recomendado por la USP XXIV (2000) para cada una de las categorías de métodos analíticos.

La validación de estos ensayos permitió tener elementos para demostrar la consistencia de los resultados obtenidos por la ejecución de los mismos, reduciendo la variabilidad de las determinaciones y las repeticiones innecesarias (repruebas). Por otra parte, está demostrado que aunque la ejecución de las validaciones son procesos costosos, a corto

Discusión general

plazo (costos de prevención), los mismos van a redundar en una disminución de los costos de fallos, a largo plazo, por concepto de reanálisis y de rechazo de productos aptos, lo que se traduce en una disminución de los costos totales de calidad (Alba y Mitjans, 1998) y en una garantía para el producto.

El cumplimiento de los requisitos de validación para cada tipo de método, proporciona un alto grado de confianza y seguridad del método analítico; así como en la calidad de los resultados; un aumento de la productividad; disminución de los rechazos; de los costos; y se logra, además, un mayor conocimiento e identificación del personal con el método analítico (Fernández, 1996).

El uso del MRI para el control interno de los ensayos de cuantificación de fosfolípidos totales (ZilverSmith, 1950) y fosfolípidos disaturados (Mason y col., 1976), permitirá chequear la variabilidad de los resultados que se obtengan lote a lote, mediante el análisis de los rangos críticos (CR) obtenidos de las validaciones de estos ensayos, como vía de eliminar la incertidumbre de la influencia de las muestras de producto objetos de evaluación, en la precisión de los resultados (ISO 5725-3, 1994). Por otra parte, al demostrarse la linealidad de ambos ensayos en el rango de trabajo, permite disminuir los niveles de concentraciones de la curva de calibración, para los ensayos de rutina (tres niveles con tres réplicas), lo que trae consigo una disminución de los costos de calidad de estos ensayos. Ambos criterios (precisión y linealidad) son indicadores primarios utilizados por los analistas, día a día, para establecer la conformidad técnica de cada ejecución del método analítico, por lo que asegura la calidad analítica, y permite discriminar la conformidad o no del producto evaluado con mayor certeza.

La utilización del MRI para el control interno del ensayo de CCD, tendrá un gran valor desde el punto de vista cualitativo, ya que permitirá identificar, lote a lote, cada uno de los fosfolípidos fundamentales (principios activos y producto de degradación) presentes, mediante la comparación de los perfiles cromatográficos del medicamento con el MRI; así mismo permitirá chequear la variabilidad de los resultados.

El establecimiento de este tipo de control posibilita monitorear la consistencia de las mediciones día a día, con la presencia del MRI como indicador de la verdad o del valor real, permitiendo corregir errores que se pudieran presentar y tomar decisiones antes de emitir los resultados.

#### Discusión general

Una vez que se cuenta con la metodología analítica fundamental de evaluación de este importante medicamento validada; y con Materiales de Referencia Internos para el control interno de estos ensayos de evaluación, estamos en un estadio superior del control del producto, ya que existe un mayor conocimiento de las debilidades y fortalezas de dichos ensayos lo que permite al analista influir positivamente sobre los puntos críticos (Virlichie y Ayade, 1995) que pudieran afectar los resultados. Además, permite cumplir con lo recomendado por las Buenas Prácticas de Laboratorio (Regulación 37, 2004).

Con los resultados de este trabajo están creadas las bases para materializar los controles internos de estos ensayos, para lo cual era necesario, primeramente, contar con todas las medidas organizativas y de aseguramiento de la calidad que recomiendan estas normas, tener las técnicas validadas, y contar con muestras controles y/o materiales de referencias para evaluar la exactitud y la precisión día a día, a través de los gráficos controles que permitirán detectar tendencias de los resultados, es decir, cercanía o no del valor real (exactitud), o la variabilidad de los resultados alrededor de la media (precisión) (Alvar, 1989). Estos gráficos permitirán monitorear la estabilidad de dichos procedimientos.

La factibilidad económica de la tecnología es un criterio importante a tener en cuenta para evaluar la validez de la misma (Ciño y De Armas, 1996), la cual fue demostrada mediante un estudio de comparación entre la variante de obtención del MRI en el laboratorio, y la variante alternativa, relacionada con la compra de MRC comerciales, resultados que evidenciaron las ventajas económicas de nuestra propuesta. Esto unido a la factibilidad técnica comprobada mediante la contrastación de los lotes de MRI obtenidos contra los MRC puros, aseguran la obtención de un producto que proporcionará grandes ventajas desde el punto de vista analítico, a la vez, que ofrece la confianza requerida a los clientes.

La evaluación externa, como aspecto fundamental de la calidad analítica, es una meta futura prevista, por la seguridad que ofrece la comparación de los resultados mediante estudios interlaboratorios, pero no todos los laboratorios tienen las posibilidades reales de participar en este tipo de confrontación, de ahí la necesidad de utilizar en el control interno de los ensayos, materiales de control que han sido previamente contrastados contra MRC (Iyengar y Wolf, 1997), permitiendo de una forma indirecta la evaluación externa de los métodos de ensayos.



# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- Se demostró que los métodos analíticos utilizados para la caracterización de los MRI, cumplen con los indicadores establecidos para los fines previstos, por lo que garantiza la obtención de resultados confiables.
- Se logró un nuevo sistema de análisis de fosfolípidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución más rápido y sencillo que el método de Cromatografía de Capa Delgada convencional.
- Se obtuvo una fuente alternativa de fosfolípidos (pulmón de conejos), factible técnica y económicamente por presentar los componentes de interés, tener mayor rendimiento, ser más disponible y gastar menos volúmenes de solventes orgánicos para su procesamiento.
- Se obtuvieron dos tecnologías consistentes para la obtención de Materiales de Referencia Internos para control de los métodos bioquímicos y biológico de control de calidad del SURFACEN, demostrado a través de los lotes caracterizados.



# **RECOMENDACIONES**

## RECOMENDACIONES

- Culminar los estudios de estabilidad y la caracterización del MRIB con la evaluación externa mediante estudios colaborativos.
- Comprobar de forma comparativa el sistema analítico propuesto por CLAR con el de CCD con, al menos, muestras de tres lotes de SURFACEN.
- Continuar la introducción de los resultados de las validaciones, los MRI y MRIB en el control de calidad del producto.





# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Agrawal, A. K.; Ganju, S.; Lal, K. y Gupta, P. K. (1997). Preparation of certified Reference Materials of Fluoride and Nickel in High Purity water for environmental and Food Laboratories. Seven International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials.
2. Alajos B. y Horvath G. (2003). Lipid rafts in the plant plasma membrane. *Acta biologica Szegediensis*. Vol 47 (1-4): 7-10.
3. Alba, G. y Mitjans, Y. (1998). Costos de calidad: un instrumento de gestión empresarial. *Normalización*. No. 3: 6-12.
4. Alfonso, W. (1995). Expediente maestro de producción de SURFACEN. Ed. 2. CENSA, La Habana, Cuba.
5. Alfonso, W. (1997). Registro de SURFACEN. CECMED. Parte I. Química- Farmacéutica. La Habana, Cuba.
6. Allen, V.; Oulton, M.; Stinson, D.; Macdonald, J. y Alien, A. (2001). Alveolar metabolism of natural vs synthetic surfactants in preterm newborn rabbits. *J. Appl. Physiol.* 90: 198- 204.
7. Almog, R.; Saulsbery, R. A. y Goldkrand, J.W. (1996). Microcentrifugation assay of phospholipids in lung surfactant from amniotic fluid. *Anal Biochem*; 242 (1): 147-150.
8. Alvar, L. A. (1989). Estadística mínima en el control de la calidad de laboratorio. *Lab. acta*, 1/1: 21-23.
9. Alvarez, L. (1996). I Curso de determinación de fármacos por HPLC en fluidos biológicos. Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Salamanca.
10. Amador, A. y Miranda, I. (2000). Software para estudios interlaboratorios. EDICENSA. 38p.
11. Amato, M.; Petit, K.; Fiore, H.H.; Doyle, C. A.; Frantz, I. D. y Nielsen, H. C. (2003). *Pediatr Res*. 53. 671-8.
12. Amirkhanian, J. D. y Merritt, T. A. (1998). Inhibitory effects of oxyradicals on surfactant function: utilizing in vitro fenton reaction. *Lung*. 176 (1): 63-72.
13. Anderson, S.; Kheiter, A. y Merrit, T. A. (1999). Oxidative inactivation of surfactants. 177: 179- 189.
14. Ang, C. Y. y Luo, W. (1997). Rapid determination of ampicillin, in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. OAAC*; 80 (1): 25-30.

15. Anónimo. (2001). Agent for Respiratory Distress Syndrome. *J Am Pharm Assoc* Vol. 2, 41: 229- 272.
16. Avery, M. E. y Meal, J. (1959). Surface properties in relation to atelectosia and hyaline membrane disease. *A.m. J. Dis. Child.* 97: 519-523.
17. Backer, P. y Vermeersch, H. (1996). Validation of a liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma. *J. Chrom. Biomed. Appl*; 682 (2): 301-308.
18. Badar, S. (1995). Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of furosemide in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry by the American Chemical Society*: 2117-2121.
19. Bamio, N. A. y Artelejo, O. B. (1992). Validación analítica: Aplicación a un método por cromatografía líquida de alta resolución para el análisis de Benzodiazepinas. *Cir. Far.* 316: 295- 308.
20. Bartleet, W. C. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* 234:466-468.
21. Benitez, J. L. (1997). Procedimiento a seguir para llevar a cabo la validación de técnicas analíticas. Versión 1, p 11.
22. Bode, P. (1996). Quality management at the analytical laboratory an inevitable compliance with a new order. *J Anal Chem* 51(12): 1153-1159.
23. Bodil, R.; Leppimaki, P.; Axberg, M. y Peter, S. (1999). Analysis of natural and synthetic sphingomyelins using HPTLC. *European Journal of Biochemistry.* Vol. 266: 997.
24. Briand, R.L. (1981). HPLC determination of lecithin/sphingomyelin ratio in amniotic fluid. *Journal of chromatographic*, 223: 277- 284.
25. Caboni, M. F. ; Boselli, E. y Menotta, S. (2000). HPLC-ELSD determination of Phospholipids and lysophospholipids in Grana cheese samples. *Scienza e Técnica Lattiero-casearia, Ass. Italiana Tecnici del Latte, Modena*, pp. 7-24.
26. Campmany, A. C. (1990). Validación de métodos analíticos. *Farm. Clin.* 7(9): 749-758.
27. Caporal, J. (1990). *STP Pharma.* 6 (8), 588- 594.
28. Castro; N.; Gascón, s. y Pujol, N. (1989). Validación de métodos analíticos. Monografía AEFI.
29. Chida, S. y Fujiwara, T. (1996). Molecular aspects of pulmonary surfactant in neonatal respiratory distress syndrome and surfactant replacement therapy. *Nippon Rinsho*; 54 (2); 346-352.

30. Chiesi, P.; Ventura, P.; Pighi, R.; Servadio, V. y Rechia, W. (1994). A process for the purification of natural pulmonary surfactant material using supercritical fluids. International Patent Classification WO 94/125 25.
31. Christie, W. (1992). Gas chromatography and lipids. A Practical Guide. ISBN 09514171-0-X. p: 34-37
32. Ciño, D. M y De Armas, C. A. (1996). Metodología para la evaluación económica de proyectos de investigación agropecuarios. Curso Nacional.
33. Clements, J. A. y Avery, M. E. (1998). Lung Surfactant and Neonatal Respiratory Distress Syndrome. Am J Respir Crit Care Med 157: 59-66.
34. Clements, J.A. (1956). Dependence of pressure-volume characteristics of lungs on lungs on intrinsic surface-active material. Am. J. Physiol. 187-592.
35. Cockshutt, A. M.; Absolom, D. R. y Posmayer, F. (1991). The role of palmitic acid in pulmonary surfactant: enhancement of surface activity and prevention of inhibition by blood proteins. Biochimica et Biophysica Acta 1085: 248-256.
36. Cockshutt, A. M. y Posmayer, F. (1992). Metabolism of surfactant lipid and proteins in the developing lung en "Pulmonary surfactant; from molecular biology to clinical practice." B. Robertson; L.M.G. Van Golde; Batenburg J.J. (Eds.) Elsevier, Amsterdam. 339-378.
37. Curry, S. H. y Whelpton, R. (1978). Statistics of drug analysis, and the role of internal standards. Blood
38. Daniels, C. B.; Orgeig, S. y Smits, A. W. (1995). The evolution of the vertebrate pulmonary surfactant system. Physiol Zool 68: 539-566.
39. Davis, P.; Lafón, R.; Large, T.; Morgan, E. D. y Wilson, I. D. (1993). Micellar capillary electrophoresis of the esterooids chromatographia; 37 (1-2): 37-42.
40. Descalzo, A. M. (2003). Light-scattering detection of phospholipids resolved by HPLC. Lipids, 38, 999-1003.
41. Díaz, E. (1995). Optimización de parámetros de la centrifugación en la obtención de SURFACEN. Rev. Salud Anim. 17: 171-174.
42. Díaz, E. (1999). Desarrollo del proceso de obtención de SURFACEN por nuevas tecnologías. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Técnicas. La Habana, Cuba.
43. Díaz, E.; Alfonso, W.; Manzanares, D. y Villanueva, G. (2004). Procedimiento para la obtención de surfactante pulmonar. A 61K35/12, 35/42.

44. Díaz, S. B.; Biondi, A. C. y Disalvo, E. A. (2001). Acción de lisoderivados en la interfaz lipídica modificada por carbohidratos. *Rev. Cub. Quim.* Vol. XIII, No.2, ISSN- 058- 5995: 128.
45. Dittrich, N.; y Ulbrich, R. H. (2001). Transphosphatidylation by immobilized phospholipase D in aqueous media. *Biotechnol. Appl. Biochem.* Vol. 34: 189- 194.
46. Duck- Chong, C. G.; Baker, G. J.; Murdoch, S. R. y Price, R. M. (1984). Methods for extracting phospholipids from human amniotic fluid compared. *Clin Chem.* Feb; 30(2): 271-274.
47. Edwards, S. (2000). 24<sup>th</sup> International Symposium on HPLC and related techniques. Preliminary program. p70.
48. Encinar, J. A.; Ludena, M. D.; Sanchez, Y. J. y Llanillo, M. (1996). Enzimatic determination of phosphatidilcholine sphingomyelin and phosphatidyl glycerol in lipid dispersions, blood cell membranes and rat pulmonary surfactant. *European Journal of clinical Chemistry and clinical Biochemistry* 34/1: 9-15.
49. Enhorning, G. (1997). Pulsating bubble technique for evaluating pulmonary surfactant. *Appl. Physiol* 43: 198-203.
50. Eurachem Guide. (1998). The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics.
51. Fernández, S. A. (1996). Validación de Técnicas analíticas. CIDEM.
52. Findlay, R. D.; Taeaush, H. W. y Walther, F. J. (1996). Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. *Pediatrics*: 48-52.
53. Finkelson, M. J. (1994). Validation of analytical methods by FDA laboratories II. *Pharmaceutical Technology*, March: 74-84.
54. Firlong, S. T.; Gorti, R.; Catalano, R. J. y Rose, R. M. (1991). Lipid Content of Alveolar Lining Material Collect by Bronchoalveolar Lavage. Improved Methods for measuring the Major Lipid Classes. *AM Rev. Respir. Dis.* 145: 383-387.
55. Florence, B. y Veuthey, J. L. (1996). Validation of HPLC methods on two silica base- deactivated reversed phases for the detremination of chroprocaine and bupivacaine. *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 14: 1251- 1259.
56. Folch, J.; Lees, M. y Sloane, G. S. (1957). Stanley. *J. Biol. Chem.* 226: 497 - 509.
57. Francoise, B. y Petit, M. B. (1996). Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *Journal of chromatography B*, 686: 3-10.

58. Fujiwara, T.; Chida, S.; Watebe, Y.; Maeta, H.; Murita, T. y Abet. (1980). Artificial Surfactant therapy in hyaline membrane disease. *The Lancet* 8159: 55-59.
59. Fujiwara, T.; Tanaka, Y. y Takel, T. (1982). Lung tissue extract useful for treating hyaline membrane disease and method for producing the extract. United States Patent, A 61K 35/12.
60. Gil, A. E. (1995). Protocolo de Validación de Métodos de Análisis. Materias primas y Productos terminados. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.
61. Goerke, J. (1998). Pulmonary surfactant: functions and molecular composition. P: 79- 89.
62. Goerke, J. y González, J. (1981). Temperature dependence of dipalmitoyl phosphatidylcholine monolayer stability. *J. Appl. Physiol* 63; 1979-1986.
63. Gonzáles, R. (1996). Protocolo de Validación de Técnicas Analíticas para la determinación cuantitativa en el control de la calidad y/o en estudios de estabilidad de materias primas o principios activos de medicamentos. Centro de Química Farmacéutica. División de calidad. Cuba.
64. Green, J. M. (1996). A practical Guide to Analytical Method Validation. *Analytical Chemistry* (68): 305A-309A.
65. Griepink, B. (1990). The role of CRM in measurement systems. *Fresenius J Anal Chem* 338: 360-362.
66. Gross, C. S.; Simms, P.J.; Towne, R. W. y Miller, R. E. (2000). Quantitative determination of dipalmitoylphosphatidylcholine and palmitic acid in porcine lung surfactants used in the treatment of respiratory distress syndrome. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000 Jul 21 ;744(2):407-13 (ISSN: 1387-2273).
67. Grossmann, G.; Tashiro K.; Kobayaski, T.; Suzuki, Y.; Matsumoto, Y.; Waseda, Y.; Akino, T.; Cursted, T. y Robertson, B. (1999). Experimental neonatal respiratory failure induced by lysophosphatidylcholine: effect of surfactant treatment. *J. Appl. Physiol* 86 (6): 633-40.
68. Haller, T.; Ortmayr, J.; Friedrich, F.; Volkl, H. y Dielt, P. (1998). Dynamics of surfactant release in alveolar type II cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1579-1584.
69. Halliday, H.L. (1996). Natural vs synthetic surfactants in neonatal respiratory distress syndrome. *Drugs*, 51 (Feb): 226-237.
70. Hames, B. D.; Hooper, N. M. y Houghton, J. D. (1998). *Notes in Biochemistry*: 97- 103.

71. Hamilton L.; Greiner R.; Salem N. J. y Kim H. Y. (2000). n-3 fatty acid deficiency decreases phosphatidylserine accumulation selectively in neuronal tissues. *Lipids* Aug;35(8):863-9.
72. Hinckley, C. M. (1997). Defining the best Quality Control Systems by design and inspection. *Clin Chem.* 43: 5.
73. Hiroshi M. y Magobei Y. (1996). Thin Layer chromatography and high performance liquid chromatography for the assay of fatty acid compositions of individual phospholipids in platelets from non- insulin- dependent diabetes mellitus patients: effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester administration. *Journal of chromatography B*, 677: 217-223.
74. Hoek, F. J.; Weerheim, A. M.; Kolb, A. M.; Sturk, A. y Nieuwland, R. (2003). Phospholipid composition of cell- derived microparticles determined by onedimensional HPTLC. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* Vol. 1. Supplement 1.
75. Holm, B.A.; Kopur, P.; Irish, M. S. y Click, P.L. (1997). Physiology and pathophysiology of lung development. *J. Obstetr Gynoecology* 17: 519-527.
76. Holm, B.A.; Wang, Z.; Egan, E. A. y Notter, R. H. (1996). Content of dipalmitoylphosphatidylcholine in lung surfactant: ramifications for surface activity. *Pediatr Res*; 39 (5): 805-811.
77. Hyltoft, P. P. (1993). External analytical quality assurance for proteins. *Upsala J Med Sci.* 98: 241-58.
78. Hyltoft, P. P. (1994). Assessing quality in measurements of plasma proteins. *Nordic Clinical Chemistry Project*: 19-39.
79. Hyltoft, P. y Licós. (1996). Proposed Guidelines for the Internal Quality Control of Analytical Results in the Medical Laboratory. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*34: 983- 999.
80. Ingvarsdén, L.; Michaelsen, S. y Soerensen, H. (1994): Analysis of individual phospholipids by High Performance Capillary electrophoresis. *J Am Oil Chem Soc.* Feb 71 (2): 183-188.
81. ISO 10993-12. (2002). Biological evaluation of medical devices. Sample preparation and reference materials.
82. ISO 2602. (1980). Statistical interpretation of test results. Estimation of the mean. Confidence interval.
83. ISO 3534-2. (1993). Statistics. Vocabulary and symbols. Part 2. Statistical quality control. Norma..
84. ISO 5725- 2. (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods an

results- Parte 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method.

85. ISO 5725- 6. (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.
86. ISO- 5725-3. (1994). Precision of test methods. Determination of repeatability and reproducibility for a standard test method by inter- laboratory test.
87. ISO 9000 (2000). Quality management systems. Fundamentals and vocabulary.
88. ISO 9001 (2000). Sistema de Gestión de la Calidad. Requisitos
89. ISO-5725-1. (1991). Accuracy. General Principles and Definition.
90. Iyengar, V. y Wolf, W. (1997). Global activities in the world of secondary Reference Materials. Seven International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials.
91. Jansen, T. P. y Blaton, V. (1998). Additional Essential Criteria for Quality Systems of Medical Laboratories. Clin Chem Lab Med; 36 (4): 249-252.
92. Jobe, A. H. (1993). Pulmonary surfactant therapy. New. Eng. J. Med. 328: 861-868.
93. Johansson, J.; Curstedt, T. y Robertson, B. (1994). The protein of the surfactant system. Eur Respir. J7: 372-391.
94. Kang, D.H. (2002). Separation of soybean phospholipids by HPLC. J Chromatogr A, 949, 217-223.
95. Kattwinkel, J. (1998). Surfactant: Evolving issues. Clin Perinatol 25: 17-32.
96. Keough, K.M. (1992): Physical chemistry of pulmonary surfactant in the terminal air space en pulmonary surfactant from molecular biology to clinical practice. Elsevier, Amsterdam: 109-164.
97. Kidd, P. M. (2000). Dietary phospholipids as anti- aging nutraceuticals. In Klatz, R., A.; Goldman, R, eds. Anti- aging Medical therapeutics, Vol. IV, IL, P: 282- 300.
98. Koty, P. P.; Tyurina Y. Y.; Tyurin, V. A.; Li, S. X. y Kagan, V. E. (2002). Depletion of Bcl2 by an antisense oligonucleotide induces apoptosis accompanied by oxidation and externalization of phosphatidylserine in NCI-H226 lung carcinoma cells. Mol Cell Biochem. 234- 235 (1-2): 125- 33.
99. Lendrath, G.; Bonekramp, A. y Kraus, L. (1991). Quantitative planar chromatography of phospholipids with different fatty acid compositions. Journal of chromatography, 588: 303-305.
100. Lewis, J. F. (2004). Surfactant- Where are we in 2003?. Journal of the

- Canadian Thoracic society. Vol. 11, 03: 204-206.
101. Lewis, J. F. y Veldhuizen, R. (2003). The role of exogenous surfactant in the treatment of acute lung injury. Annual Review of physiology. Vol. 65: 613- 642.
  102. Libeer, J. C. (1993). External quality assessment in clinical laboratories. Thesis, Antwerpen.
  103. Libeer, J. C. (1996). Characterization and classification of external quality assessment schemes (EQA) according to the objectives such as examination of method and participant bias and standard deviation. Eur J Clin Chem Clin Biochem 34: 665-78.
  104. Lipinski, J. (1997). COOMET and its activities in the field of Reference Materials. Seven International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials.
  105. Lopatko, O. V.; Orgeig, S.; Paniels, C. B. y Palmer, D. (1998). Alterations in the surfactant in the turpid marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. Am Physiol Soc. 146-156.
  106. Lucangioli, S.; Rodríguez, V. y Carducci, C. (1999). Capillary electrophoretic method for quality control of phospholipid products. Rivista di Scienze Farmaceutiche e Biologiche. Vol 138.
  107. Magoon, M. W.; Wright, J. R.; Baritussio, A. y Williams, M. C. (1983). Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. Biochim. Biophys. Acta. 750: 18-31.
  108. Mallinger A. G.; Yao J. K.; Brown A. S. y Dippold C. S. (1994). Analysis of complex mixtures of phospholipids classes from cell membranes using Two dimensional thin layer chromatography and scanning laser densitometry. J. Chromatogr., Biomed., 125 (1): 67-75.
  109. Manoj, G. P.; Ateeque, A.; Toshihiro, Y.; Toro, N. y Yasushi, K. (2002). Biosynthesis of Triacylglycerol Molecular Species in an Oleaginous Fungus, *Mortierella ramanniana* var. *angulispora*. J. Biochem. Vol. 132, pp. 121-126.
  110. Manzanares, D. (1995). Obtención, caracterización bioquímica y propiedades tensoactivas de un surfactante pulmonar de origen porcino.
  111. Manzanares, D.; Díaz, E.; Alfonso, W.; Escobar, A.; Colomé, H.; Muñoz, M., C.; Noa, M.; Rabell, S. E. y Hidalgo, A. (1997). Surfactant pulmonar natural porcino. República de Cuba, A 61K 35/42.

112. Mason, R. J.; Nellenbogen, J. y Clements, J. A. (1976). Isolation of disaturated phosphatidylcholine with osmium tetroxide.. J. Lipid Research 17; 281.
113. Massart, D. L. (1988): Chemometrics a Textbook. Elsevier, NY.
114. Massart, D. L. y Verbeke, J. S. (1994): An introduction to method validation. Analisis Magazine, Vol. 22. No.5.
115. Mayuko, I. (2001). Microanalysis of Phospholipids of Mammalian Cells by Liquid Chromatography/ Electropray Ionization- Mass Spectrometry. J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., 49 (4), 150- 160.
116. Mériguet, P. y Maier, E. (1997). Importance of certified reference materials for the European Union Seven International Symposiums on Biological and Environmental Reference Materials.
117. Microsoft EXCEL. (2002).
118. Miller, J. C. y Miller, J. N. (1984). Statistics for analytical Chemistry. Ed. by Ellis Horwood Ltd. N.Y.
119. Miwa, H.; Yamamoto, M.; Futata, T.; Kan, K. y Asano, T. (1996). Thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography for the assay of fatty acid compositions of individual phospholipids in platelets from non insulin -dependent diabetes mellitus patients: effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester administration. Journal of chromatography B: Biomedical Applications, 677: 217-223.
120. Moreno O.; Lee M. y Domínguez F. (1994). Estudio de la eficacia del Surfacten en la oxigenación y ventilación del distress respiratorio del recién nacido. Informe final del ensayo clínico. Cuba, CENSA, MINSAP: 37.
121. Morón A.; Luaces J.; Esteban J. C.; Medina D.; Sánchez J. M. y Manzano J. L. (1996). Efectos de la administración de surfactante a recién nacidos con distress respiratorio grave. Med Clin Bare: 107 (5): 165-168.
122. Murphy, R. C. (2002). Mass Spectrometry of Phospholipids: Tables of Molecular and Products Ions. ISBN 0970283415.
123. Murthy, M.; Hamilton, J.; Greiner, R.S.; Moriguchi, T.; Salem, N. J. y Kim, H.Y. (2002). Differential effects of n-3 fatty acid deficiency on phospholipid molecular species composition in the rat hippocampus. J Lipid Res Apr;43(4):611-7
124. NC 26-121. (1993). Medicamentos. Medicamentos no estériles. Determinación microbiológica.
125. NC- ISO Guía 30. (1998). Términos y definiciones usados en relación con los

Materiales de Referencia.

126. NC- ISO Guía 31. (1998). Contenido de los certificados de los Materiales de Referencia.
127. NC- ISO Guía 32. (2000). Calibración en química analítica y uso de los Materiales de Referencia Certificados.
128. NC- ISO Guía 33. (2000). Uso de los Materiales de Referencia Certificados.
129. NC- ISO Guía 34. (1998). Lineamientos del sistema de calidad para la producción de Materiales de Referencia.
130. NC- ISO Guía 35. (1998). Certificación de Materiales de Referencia. Principios generales y estadísticos.
131. NC ISO/ IEC 17025. (2000). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. ONN
132. Nerón, S.; El Amrani, F.; Potus, J. y Nicolas, J. (2003), Separation and quantification by HPLC-ELSD of the main phospholipids of the wheat flour during dough mixing in the presence of several (phospho)lipases. *27<sup>th</sup> Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques*, Nice-France.
133. Notter R. H. (1989). Physical Chemistry and physiological activity of pulmonary surfactants. En D. L. Shapiro, R. H. Notter (Eds) Ar Liss, Amsterdam.
134. Notter, R. H. y Shapiro, D. L. (1989). Physical Chemistry and Physiological activity of pulmonary surfactants. Amsterdam: AR Liss.
135. Nuñez, J. L.; Paloma, M. B. y Lastres, J. L. (1996). Validación de un método espectrofotométrico para la determinación analítica de clorhidrato de diltiazem. *Analítica/ Instrumentation de Laboratorio. Rev. Industria Farmacéutica*. Vol 1: 41-45.
136. Ohman, S. (1997). Quality Control for the Clinical Chemistry Laboratory. *Quality Assurance*, 5: 79-93.
137. OMS. Comité de expertos en patrones biológicos. (1990). Pautas para la preparación y caracterización y establecimientos de patrones biológicos internacionales y reactivos de referencia. Serie de informes técnicos de la OMS N°. 800: 195.
138. OMS. Technical Reports Series. (1994). No. 840. Expert Committee on biological standardization.
139. Ouhazza, M. y Siouffi, A. M. (1992). Liquid chromatography analysis of some

phospholipids with fluorescence detection. *Analisis*. Mar 20 (3): 185-188.

140. Pasteelnik, L. A. (1993). Analytical methods validation. *Pharmaceutical process validation*, Second Edition, 411- 428.
141. Pattle, R. E. (1955). Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature (Lond)*. 175: 1125-1126.
142. Perkins W. R.; Dause R. B.; Párente R. A.; Minkey S. R.; Neuman K. C.; Gruner S. M.; Taraschi T. F. y Janofl A. S. (1996). Role of lipid polymorphism in pulmonary surfactant. *Science*; 273 (5273): 330-332.
143. Phillips, P. y Robertson, Y. (1997). World Health Organization International Standards for Biologicals. Seven International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials.
144. Quatrochi, O. A.; Abelaira, S. I. y Laba, R. F. (1992). Introducción a la Cromatografía líquida de alta resolución. Aplicación y práctica. *C 12*: 301- 328.
145. Rauprich, P.; Moller, O.; Walter, G.; Herting E. y Robertson, B. (2000). Influence of modified natural or synthetic surfactant preparations on growth of bacteria causing infections in the neonatal period. *Clinical and Diagnostic Lab Immunology*. P: 817- 822, Vol. 7, No. 5.
146. Regulación 16. (2000). Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos, CECMED.
147. Regulación No. 37. (2004). Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de medicamentos. CECMED.
148. Robertson, B. y Curstedt, T. (1988). Natural pulmonary surfactant, method of preparation and pharmaceutical composition. *European Patent Application*. A 16K 37/02.
149. Robertson, B. y Lachaman, B. (1988). Experimental evaluation of surfactant for replacement therapy. *Experim. Lung Res*. 14: 279.
150. Robertson, B.; Johansson, J. y Curstedt, T. (2000). Synthetic surfactants to treat neonatal lung disease. *Molecular Medicine Today*. Vol. 6: 119-124.
151. Rodgers, K. (1994). Outcome study shows benefits of surfactants. *Drug Topics* (Jul): 40-44.
152. Rodríguez, A. M.; Blanco, M. R. y Almira, I. D. (2003). Desarrollo y validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de tabletas de ibuprofeno 200 mg. *Anuario Científico CECMED, Suplemento Especial*. Vol. 1. No. 1: 91-98.

153. Rudiger, M. (1998). Am J Physiol. 274 (1): L143-8.
154. Rudiger, M.; Haupt, R.; Wauer, R., R. y Rustoco, B. (1998). Development of pulmonary lipophilic antioxidants and peroxidizable lipids during lung maturation. AM- J-PERINATOL. 15/5: 329-333.
155. Rybert, F.; Lee, M.; Correa, F. y Navarrete, G. (1996). SURFACEN en la oxigenación y ventilación del Distress respiratorio del recién nacido. Informe final de investigación fase IV del ensayo clínico. Hospital Barros Luco- Trudeau- CENSA- CENCEC. Chile.
156. Sala Vila, A. (2003). High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipids classes in human milk, infant formulas and phospholipids sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. J Chromatogr A, 1008, 73-80.
157. Scarim, J.; Ghanbari, H.; Taylor, V. y Menon, G. (1989). Determination of phosphatidylcholine and disaturated phosphatidylcholine content in lung surfactant by high performance liquid chromatography. J Lipid Res. Apr; 30(4): 607-11.
158. Sewell, P. A. (1992). Lipid Analysis. SA practical Approach. Richard John (Ed). 1ra. Edición. Oxford University Press.
159. Shaikh B. (1995). Development and Validation of a Liquid Chromatographic Method for the Determination of Furosemide, a diuretic, in Bovine Milk. Journal of agricultural and Food Chemistry by the American Chemical Society; 2117-2121.
160. Shepens, M. H.; Van-Loenen, A. C. y Lafaber, H. N. (1996). Surfactant, saving the premature? Pharmaceutisch-Weekblad. 133. (Jun 7): 662-669.
161. Sistema estadístico SAS. (2001). Versión 8.2.
162. Soil, R. F. (1998). Natural surfactant extract vs synthetic surfactant in the treatment of established respiratory distress syndrome (Cochrane Review) En: The cochrane Library, Issue 3. Oxford: Update Software.
163. Stith, B. J. (2000). Quantification of major classes of Xenopus phospholipids. J Lipid Res, 41, 1448-1454.
164. Suchocka, Z.; Gronostajska, D.; Suchocki, P. y Pachecka, J. (2003). New HPLC method for separation of blood plasma phospholipids. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 32, No. 4, pages 859-865.
165. Szuees, R.; Verleysen, K.; Duchateau, G. S.; Sandra, P. y Vandeginste, B. G. (1996). Analysis of phospholipids in lecithins. J Chromatogr, A; 738 (1): 25-29.
166. Tausch, H. W.; Karen, L. U. y Daniela, R. S. (2002). Improving pulmonary

surfactants. Acta Pharmacol Sin. ISSN 1671-4083: 11-15.

167. Taylor, J. K. (1987). Quality Assurance of Chemical Measurement. Lewis, Chelsea, Mich.
168. Thomas, H. y Gerald, S. (1991). Validation of Bioanalytical Methods.
169. Touchstone, J. C.; Chen, J. C.; y Beaver, K. M. (1980). Improved separation of phospholipids in thin layer chromatography lipids.15: 61-62.
170. Travieso, M. C.; Betancourt, A. y Hechavarría, O., L. (1998). Validation of total tannins measurement method in natural vegetable products. Rev. Protección Veg. Vol. 13 No. 3: 189- 194.
171. Travieso, M. C. y Betancourt, A. B. (2001). Evaluation of two sources of phospholipids to manufacture a reference standard for biochemical assays of TLC. Rev. Cub. Química. Vol. XIII, No.2, ISSN- 058- 5995: 82.
172. Travieso, M. C.; Fraga, V. (2001). Evaluación del efecto de fosfolípidos específicos sobre la actividad tensoactiva "in vitro". Rev. Cub. Quim, Vol. XIII. No.2 ISSN-058-5995: 81.
173. Treybal, R. E. (1986). Operaciones con transferencia de masa. Ed. Revolucionaria, La Habana, Cuba.
174. Uldall, A. (1987). Quality Assurance in Clinical Chemistry. Scand J. Clin. Lab. Invest. 47: 187.
175. United States Pharmacopeia. (2000). 24<sup>th</sup> Rev, NF 19 USP XXIV. EEUU: 2149-2152.
176. Vademécum, 2004. Revista electrónica de registro de medicamentos. Argentina.
177. Valdés, G. M. y Cruz, S. N. (1998). Los surfactantes pulmonares. Oportunidades y estrategias de mercado para el Surfacen. Consultoría Biomundi, Cuba.
178. Van Golde, L. M. (1996). Pulmonary surfactant system. Ned Tijdschr Geneesk; 140 (5): 236-240.
179. Van Golde, L. M.; Battenburg, J. J. y Robertson, B. (1988). The pulmonary surfactant system .Biochemical aspects and functional significance. Am physiol Soc 68: 374-455.
180. Virlichie, J. L. y Ayade, A. (1995). "A ruggedness test model and its application for HPLC method validation". Pharma Pratiques 5(1): 49- 60.

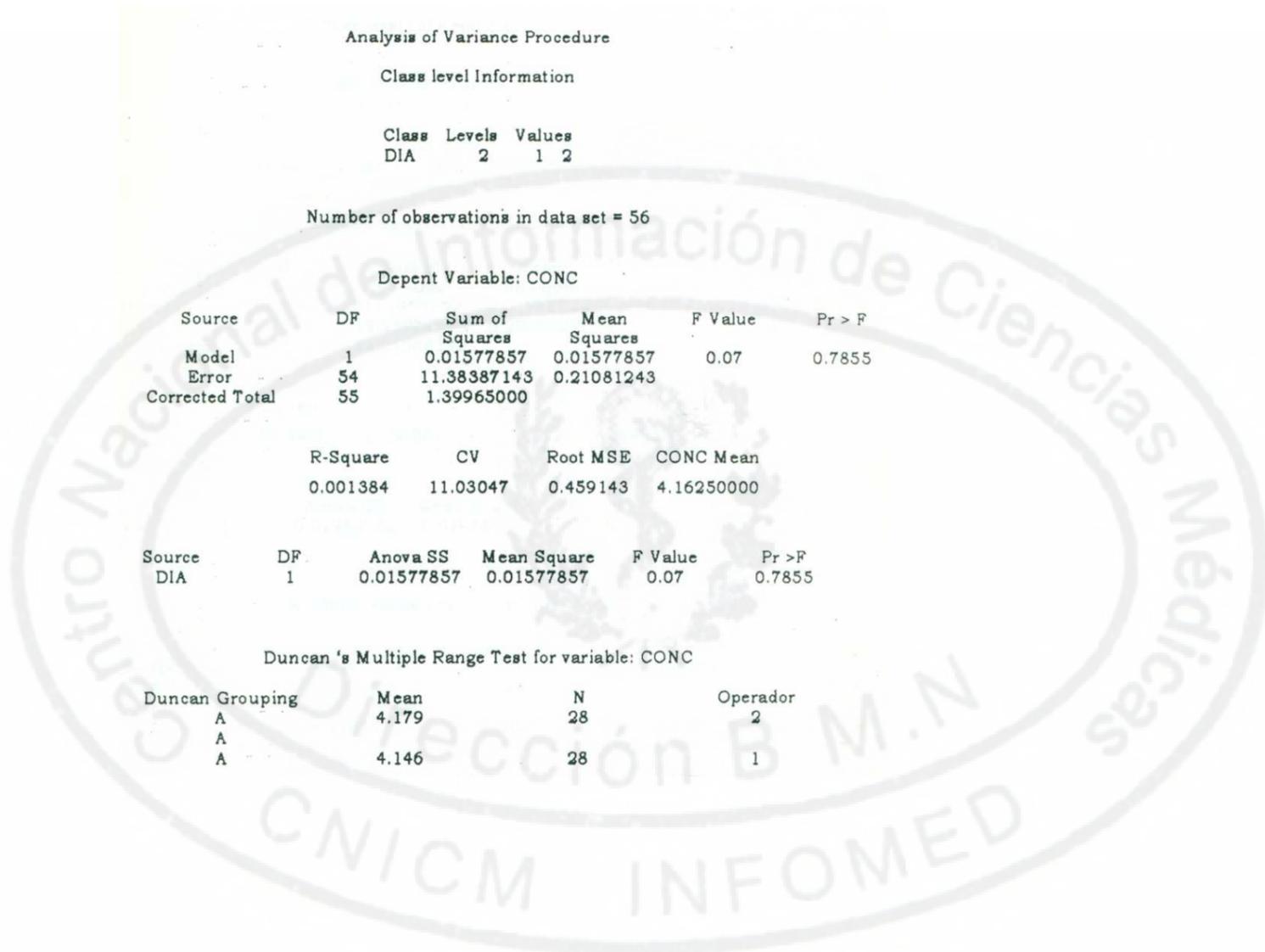
181. Walker, R. (1997). Accreditation of producers of reference materials. Seven International Symposium on Biological and Environmental Reference Materials.
182. Wang, F.; Zhao, Y. y Wang, P. (2001). Separation and determination of phospholipids in Biological samples by High performance liquid chromatography. *Journal of chromatography Science*, ISSN 0021-9665, Vol. 39, No. 10: 142- 144.
183. Wang, Z. (2004). Phospholipid synthesis in *Borrelia burgdorferi*: BB0249 and BB0721 encode functional. *Microbiology.*, 150: 391-397.
184. Wang, Z.; Hall, S. B. y Notter, R. H. (1995). Dynamic surface activity of films of lung surfactant phospholipids, hydrophobic proteins, and neutral lipids. *J. Lipid Res* 36: 1283-93.
185. Wiseman L. R. y Bryson H. M. (1994). Porcine derived lung surfactant: review of the therapeutic efficacy and clinical tolerability of a natural surfactant preparation (Curosurf) in neonatal respiratory distress syndrome. *Drugs*; 386-403.
186. Wright, J.R. y Clements, J. A. (1987). Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 136: 426-444.
187. Yoon, T.H. (2002). Preparation of purified phosphatidylcholine by HPLC. *J Chromatogr A*, 949, 209-216.
188. Youden, W .J. y Steiner, E. H. (1975). *Statistical Manual of the A.O.A.C., association of Official Analytical Chemists*, Washington DC.
189. Young, S. L. (1989). Cellular uptake and processing of surfactant lipids and apoprotein SP-A by rat lung. *J. Appl. Physiol.*, 66: 1336-1342.
190. Yu, S. H. y Possmayer, F. (1994). Effect of pulmonary surfactant protein A (SP-A) and calcium on the adsorption the cholesterol and film stability. *Biochem et Biophys Acta* 1211: 350-358.
191. Zanelli, J. M. (1982). Reference Materials: Standards and d Sample. *The Journal of Nuclear Medicine and Allied Science*. Vol. 26, N° 4: 227-234.
192. Zilversmith, D. B. y Davis, B. S. (1950). Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic acid precipitation. *J. Lab. Clin. Med.* 35: 155.



ANEXO 1

**Análisis estadísticos de los resultados de las validaciones de los métodos analíticos**

**Procesamiento estadístico de los resultados obtenidos en el ensayo de precisión en el método de cuantificación de fosfolípidos totales.**



Analysis of Variance Procedure

Class level Information

Class Levels Values

Operador 2 1 2

Number of observations in data set = 56

Depent Variable: CONC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Squares	F Value	Pr > F
Model	1	0,01968750	0,01968750	0.09	0.7693
Error	54	12.23979643	0.22666290		
Corrected Total	55	12.25948393			

R-Square 0.001606  
 CV 11.34081  
 Root MSE 0.476091  
 CONC Mean 4.19803571

Source	DF	AnovaSS	Mean Square	F Value	Pr >F
Operador	1	0.01968750	0.01968750	0,09	0,7693

Duncan 's Multiple Range Test for variable: CONC

Duncan Grouping	M can	N	Reactivo
A	4.217	28	2
A	4.179	28	1

Analysis of Variance Procedure

Class level Information

Class Levels Values  
 Equipo 2 1 2

Number of observations in data set = 56

Dependent Variable: CONC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Squares	F Value	Pr > F
Model	1	0.93086429	0.93086429	4.01	0.0502
Error	54	12.53310714	0.23209458		
Corrected Total	55	13.46397143			

R-Square CV Root MSE CONC Mean  
 0.069137 11.08591 0.481762 4.34571429

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Equipo	1	0.93086429	0.93086429	4.01	0.0502

Duncan's Multiple Range Test for variable: CONC

Duncan Grouping	Mean	N	Equipo
A	4.475	28	2
A . . . .			
A	4.217	28	1

Analysis of Variance Procedure

Class level Information

Class Levels Values  
 Reactivo 2 1 2

Number of observations in data set = 56

Dependent Variable: CONC

Source	DF	Sum of Squares	Mean F Value	Pr > F
Model	1	0,17494464	0,17494464 0,74	0.3930
Error	54	12,73915357	0,23591025	
Corrected Total	55	12.91409821		

R-Square 0,013547  
 CV 11.36772  
 Root MSE CONC Mean 0.485706 4.27267857

Source	DF	AnovaSS	Mean Square	F Value	Pr >F
Reactivo	1	0.17494464	0.17494464	0,74	0.3930

Duncan 's Multiple Range Test for variable: CONC

Duncan Grouping	Mean	N	Equipo
A	4,329	28	2
A	4,217	28	1

Analysis of Variance Procedure

Class level Information

Class Levels Values  
 COMB 2 1 2

Number of observations in data set = 56

Dependent Variable: CONC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Squares	F Value	Pr > F
Model	1	0.01857857	0.01857857	0.09	0.7632
Error	54	10.93667143	0.20253095		
Corrected Total	55	10.95525000			

R-Square CV Root MSE CONC Mean  
 0.001696 10.79867 0.450034 4.16750000

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
COMB	1	0.01857857	0.01857857	0.09	0.7632

Duncan's Multiple Range Test for variable: CONC

Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	4.186	28	4
A	4.149	28	1

Analysis of Variance Procedure  
Class level Information

Class Levels Values  
COMB 2 1 3

Number of observations in data set = 56

Dependent Variable: CONC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Squares	F Value	Pr > F
Model	1	0.45901607	0.45901607	2.05	0.1576
Error	54	12.06828214	0.22348671		
Corrected Total	55	12.52729821			

R-Square      CV      Root MSE      CONC Mean  
0.036641      11.15009      0.472744      4.23982143

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
COMB	1	0.45901607	0.45901607	2.05	0.1576

Duncan's Multiple Range Test for variable: CONC

Duncan Grouping	Mean	N	COMB
A	4.330	28	3
A	4.149	28	1

Analysis of Variance Procedure

Class level Information

Class	Levels	Values
COMB	2	2 3

Number of observations in data set = 56

Dependent Variable: CONC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	1	0.31951607	0.31951607	1.40	0.2418
Error	54	12.31668214	0.22808671		
Corrected Total	55	12.63619821			

R-Square      CV      Root MSE      CONC Mean  
 0.025286      11.22454      0.477584      4.25482143

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
COMB	1	0,31951607	0,31951607	1,40	0,2418

Duncan's Multiple Range Test for variable: CONC

Duncan Grouping	Mean	N	COMB
A	4.33	28	3
A	4.179	28	2

**Procesamiento estadístico de los resultados de precisión del método de cuantificación de DPPC.**

Analysis of Variance Procedure

Class level Information

Class	Levels	Values
DIA	2	1 2

Number of observations in data set ■ 64

Depent Variable: CONC

Source	DF	Sum of Squares	Mean Squares	F Value	Pr > F
Model	1	1.70955625	1.70955625	0.18	0.6740
Error	62	593.28121875	9.56905192		
Corrected Total	63	594.99077500			

R-Square	CV	Root MSE	CONC Mean
0.002873	6.365079	3.093388	48.5993750

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
DIA	1	1.70055625	1.70955625	0.18	0.6740

Duncan 's Multiple Range Test for variable: CONC

Duncan Grouping	Mean	N	DIA
A	48.763	32	2
A	48.436	32	1

**Procesamiento estadístico de los resultados de la especificidad del método de fosfolípidos totales.**

TTEST PROCEDURE				
Variable: DENSIDAD				
METODO	N	Mean	Std Dev	Std Error
1	3	0.48600000	0.00854400	0.00493288
2	3	0.48066667	0.02514624	0.01451819
Variances	T	DF	Prob >  t	
Unequal	0.3478	2.5	0.7565	
Equal	0.3478	4.0	0.7455	

For HO: Variances are equal,  $F = 8.66$  DF= (2,2) Prob > F = 0.2070

**Procesamiento estadístico de los resultados de la especificidad obtenidos en el método de cuantificación de DPPC.**

Wilcoxon Scores (Rank Sums) for Variable Trab 11 Classified by Variable TRAT

TRAT	N	Sum of Scores	Expected Under HO	Std Dev Under HO	Mean Score
1	4	22.0	18.0	3.44342023	5.50000000
2	4	14.0	18.0	3.44342023	3.50000000

Average Scores were used for Ties  
 Wilcoxon 2-Sample Test (Normal Approximation)  
 (with Continuity Correction of .5)  
 S= 22.0000 Z=-1.01643 Prob > |z| = 0.3094  
 T- Test approx. Significance \* 0.3433  
 Kruskal- Wallis Test (Chi Square Approximation)  
 CHISQ= 1.3494 DF= 1 Prob > CHISQ=0.2454

















**ANEXO 10  
MOD. 2 <SALARIOS S>**

**, Gastos de Salarios en los Servicios Recibidos**

Centro de Costo: \_\_\_\_\_ 001 \_\_\_\_\_ Nombre del Servicio: Ensayo de cuantificación de fosfolípidos totales  
 Código del Producto: \_\_\_\_\_ 125/97 \_\_\_\_\_  
 Lote #: \_\_\_\_\_ 010300 \_\_\_\_\_

Nombre	Ocupación	Tiempo (horas)	Tarifa horaria	Salario Básico	Salario Complementario	Seguridad Social	Gastos de Salarios
Deysi González	Técnico A	5	0.5793	6.9515	0.6318	0.9100	8.4934
<b>TOTAL</b>							8.4934

Fecha de entrega

Hecho por

Revisado por







ANEXO 14

May 1, 2001 46

----- lote=1

The TTEST Procedure

Statistics		Lower CL		Upper CL		Lower CL	
Variable	tiempo	N	Mean	Mean	Mean	Std Dev	Std Dev
LPC	0	2	-1.194	3.38	7.9542	0.2271	0.5091
LPC	1	2	0.7917	3.46	6.1283	0.1325	0.297
LPC	2						
LPC	Diff (1-2)		-1.873	-0.08	1.7132	0.217	0.4168

T-Tests		Variances		DF	t Value	Pr >
Variable	Method	Equal	Unequal			
LPC	Pooled	Equal	Unequal	2	-0.19	
LPC	Satterthwaite			1.61	-0.19	

Equality of Variances		Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LPC	Folded F	1	1	2.94	0.6724

May 1, 2001 47

----- lote=2

The TTEST Procedure

Statistics		Lower CL		Upper CL		Lower CL	
Variable	tiempo	N	Mean	Mean	Mean	Std Dev	Std Dev
LPC	0	2	0.4011	2.18	3.9589	0.0883	0.198
LPC	1	2	-1.99	2.33	6.6501	0.2145	0.4808
LPC	2						
LPC	Diff (1-2)		-1.732	-0.15	1.4321	0.1914	0.3677

T-Tests

		lpc012				
t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.7228	LPC	Pooled	Equal	2	-0.41	
0.7393	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.33	-0.41	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LPC	Folded F	1	1	5.90	0.4973

May-1, 2001 48

15:05 Tuesday,

----- lpc=3

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL	Variable	tiempo	Lower CL	Upper CL	Lower CL	Upper CL	Lower CL
Std Dev	Std Dev	Std Err	N	Mean	Mean	Mean	Std Dev
LPC			2	-6.569	3.85	14.269	0.5174
37.005	0.82						1.1597
LPC		1	2	1.4958	3.91	6.3242	0.1199
8.5743	0.19						0.2687
LPC	Diff (1-2)			-3.682	-0.06	3.5616	0.4383
5.29	0.8417						0.8417

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.9497	LPC	Pooled	Equal	2	-0.07	
0.9538	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.11	-0.07	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LPC	Folded F	1	1	18.63	0.2899

1pc018

15:05 Tuesday,

May 1, 2001 70

----- lote=1  
-----

The TTEST Procedure  
Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err		N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev
LPC 16.246	0.36		2	-1.194	3.38	7.9542	0.2271	0.5091
LPC 7.6717	0.17	1	2	1.3899	3.55	5.7101	0.1073	0.2404
LPC 2.5021	0.3981	Diff (1-2)		-1.883	-0.17	1.543	0.2073	0.3981

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.7109	LPC	Pooled	Equal	2	-0.43	
-----	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.42	-0.43	

0.7250

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LPC	Folded F	1	1	4.48	0.5617

May 1, 2001 71

----- lote=2  
-----

The TTEST Procedure  
Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err		N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev
LPC 6.3179	0.14		2	0.4011	2.18	3.9589	0.0883	0.198
LPC 13.99	0.31	1	2	-1.529	2.41	6.3489	0.1956	0.4384
LPC 2.1377	0.3401	Diff (1-2)		-1.694	-0.23	1.2335	0.1771	0.3401

T-Tests

1pc018						
t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.5686	LPC	Pooled	Equal	2	-0.68	
0.5936	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.39	-0.68	

Equality of Variances						
Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	
LPC	Folded F	1	1	4.90	0.5401	

May 1, 2001 72  
15:05 Tuesday,

----- lote=3  
-----

The TTEST Procedure							
Statistics							
Upper CL	Variable	tiempo	N	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Upper CL Std Dev
	LPC		2	-6.569	3.85	0.5174	1.1597
37.005							
	LPC	1	2	3.1606	4.05	0.0442	0.099
3.1589							
	LPC	Diff (1-2)		-3.741	-0.2	0.4285	0.823
5.1722							

T-Tests						
t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.8306	LPC	Pooled	Equal	2	-0.24	
0.8478	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.01	-0.24	

Equality of Variances						
Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F	
LPC	Folded F	1	1	137.22	0.1084	

1pc024

15:05 Tuesday

May 1, 2001 94

----- lote=1  
-----

The TTEST Procedure  
Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err	N	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Upper CL Std Dev
LPC 16.246	0.36 0	2	-1.194	3.38	0.2271	0.5091
LPC 17.149	0.38 4	2	-1.018	3.81	0.2398	0.5374
LPC 3.2897	Diff (1-2) 0.5235		-2.682	-0.43	0.2725	0.5235

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.4977	LPC	Pooled	Equal	2	-0.82	
	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.99	-0.82	

0.4979

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LPC	Folded F	1	1	1.11	0.9656

May 1, 2001 95

----- lote=2  
-----

The TTEST Procedure  
Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err	N	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Upper CL Std Dev
LPC 6.3179	0.14 0	2	0.4011	2.18	0.0883	0.198
LPC 4.5128	0.1 4	2	1.6794	2.95	0.0631	0.1414
LPC 1.0813	Diff (1-2) 0.172		-1.51	-0.77	0.0896	0.172

T-Tests

		lpc024					
t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >	
0.0465	LPC	Pooled	Equal	2	-4.48		
0.0557	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.81	-4.48		

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LPC	Folded F	1	1	1.96	0.7897

May 1, 2001 96

15:05 Tuesday,

lote=3

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL	Variable	tiempo	N	Lower CL	Mean	Upper CL	Lower CL	Std Dev	Std Dev
Std Dev	Std Err			Mean	Mean	Mean	Std Dev	Std Dev	
LPC			2	-6.569	3.85	14.269	0.5174	1.1597	
37.005	0.82								
	0								
LPC		2	2	3.3676	4.13	4.8924	0.0379	0.0849	
2.7077	0.06								
	4								
LPC	Diff (1-2)			-3.818	-0.28	3.2576	0.4281	0.8222	
5.1673	0.8222								

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.7659	LPC	Pooled	Equal	2	-0.34	
0.7906	LPC	Satterthwaite	Unequal	1.01	-0.34	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
LPC	Folded F	1	1	186.78	0.0930

T-Tests

dppc012

15:05 Tuesday,

May 1, 2001 34

----- lote=1  
-----

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err		N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev
DPPC 3.0942	0.4816 0		5	35.179	36.516	37.853	0.6451	1.0768
DPPC 2.3164	0.4024 1	1	8	34.449	35.4	36.351	0.7525	1.1381
DPPC 1.8952	Diff (1-2) 0.6363 2			-0.285	1.116	2.5166	0.7907	1.1162

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.1072	DPPC	Pooled	Equal	11	1.75	
0.1090	DPPC	Satterthwaite	Unequal	9.02	1.78	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	7	4	1.12	0.9710

May 1, 2001 35

----- lote=2  
-----

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err		N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev
DPPC 8.6926	1.3528 0		5	35.516	39.272	43.028	1.8124	3.025
DPPC 18.491	2.4796 1	1	4	30.559	38.45	46.341	2.8093	4.9592
DPPC 8.0822	Diff (1-2) 2.6639 2			-5.477	0.822	7.121	2.6256	3.9711

T-Tests

dppc012						
t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.7666	DPPC	Pooled	Equal	7	0.31	
0.7834	DPPC	Satterthwaite	Unequal	4.74	0.29	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	3	4	2.69	0.3635

May 1, 2001 36

15:05 Tuesday,

----- lote=3

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL	Variable	tiempo	N	Lower CL	Mean	Upper CL	Lower CL	Std Dev	Std Dev
Std Dev	Std Err			Mean	Mean	Mean	Std Dev	Std Dev	
DPPC			5	37.193	38.284	39.375	0.5262	0.8783	
2.5239	0.3928								
	0								
DPPC		1	4	35.074	38.12	41.166	1.0845	1.9145	
7.1381	0.9572								
	2								
DPPC	Diff (1-2)			-2.086	0.164	2.4138	0.9377	1.4183	
2.8866	0.9514								

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.8680	DPPC	Pooled	Equal	7	0.17	
0.8817	DPPC	Satterthwaite	Unequal	4.01	0.16	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	3	4	4.75	0.1663

May 1, 2001 58

----- lote=1  
-----

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err		N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev
DPPC 3.0942	0.4816 0		5	35.179	36.516	37.853	0.6451	1.0768
DPPC 10.52	1.4107 8	1	4	30.72	35.21	39.7	1.5983	2.8215
DPPC 4.1082	Diff (1-2) 1.354			-1.896	1.306	4.5078	1.3346	2.0185

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.3669	DPPC	Pooled	Equal	7	0.96	
0.4341	DPPC	Satterthwaite	Unequal	3.7	0.88	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	3	4	6.87	0.0936

May 1, 2001 59

----- lote=2  
-----

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err		N	Lower CL Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev
DPPC 8.6926	1.3528 0		5	35.516	39.272	43.028	1.8124	3.025
DPPC 16.333	2.1903 8	1	4	32.13	39.1	46.07	2.4815	4.3806
DPPC 7.465	Diff (1-2) 2.4605			-5.646	0.172	5.9901	2.4251	3.6678

T-Tests

dppc018						
t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.9462	DPPC	Pooled	Equal	7	0.07	
0.9492	DPPC	Satterthwaite	Unequal	5.16	0.07	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	3	4	2.10	0.4867

May 1, 2001 60

----- lote=3  
-----

The TTEST Procedure  
Statistics

Upper CL Variable Std Dev	tiempo Std Err		Lower CL N	Mean	Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Std Dev
DPPC 2.5239	0.3928		5	37.193	38.284	39.375	0.5262	0.8783
DPPC 6.3801	0.8556	1	4	34.997	37.72	40.443	0.9694	1.7112
DPPC 2.6503	0.8735	Diff (1-2)		-1.502	0.564	2.6296	0.861	1.3022

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.5391	DPPC	Pooled	Equal	7	0.65	
0.5796	DPPC	Satterthwaite	Unequal	4.26	0.60	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	3	4	3.80	0.2303

T-Tests

dppc024

15:05 Tuesday,

May 1, 2001 82

----- lote=1  
-----

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL Variable	tiempo	N	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Upper CL Std Dev
DPPC 3.0942	0.4816 0	5	35.179	36.516	37.853	0.6451	1.0768	
DPPC 7.769	1.0418 4	2 4	30.124	33.44	36.756	1.1804	2.0837	
DPPC 3.233	Diff (1-2) 1.0656		0.5563	3.076	5.5957	1.0503	1.5885	

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.0234	DPPC	Pooled	Equal	7	2.89	
0.0515	DPPC	Satterthwaite	Unequal	4.27	2.68	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	3	4	3.74	0.2347

May 1, 2001 83

----- lote=2  
-----

The TTEST Procedure

Statistics

Upper CL Variable	tiempo	N	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Mean	Upper CL Mean	Lower CL Std Dev	Upper CL Std Dev
DPPC 8.6926	1.3528 0	5	35.516	39.272	43.028	1.8124	3.025	
DPPC 10.204	1.3683 4	2 4	33.735	38.09	42.445	1.5503	2.7366	
DPPC 5.9123	Diff (1-2) 1.9487		-3.426	1.182	5.7899	1.9207	2.9049	

T-Tests

dppc024						
t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.5633	DPPC	Pooled	Equal	7	0.61	
0.5589	DPPC	Satterthwaite	Unequal	6.83	0.61	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	4	3	1.22	0.9052

May 1, 2001 84

15:05 Tuesday,

lote=3

The TTEST Procedure  
Statistics

Upper CL	Variable	tiempo	Lower CL	Upper CL	Lower CL	Upper CL	Lower CL
Variable	tiempo	Std Dev	Std Err	N	Mean	Mean	Mean
DPPC	0	2.5239	0.3928	5	37.193	38.284	39.375
DPPC	2	11.93	1.5998	4	31.839	36.93	42.021
DPPC	4	4.4722	1.474		-2.132	1.354	4.8395
	Diff (1-2)						1.4528
							2.1974

T-Tests

t	Variable	Method	Variances	DF	t Value	Pr >
0.3889	DPPC	Pooled	Equal	7	0.92	
0.4654	DPPC	Satterthwaite	Unequal	3.36	0.82	

Equality of Variances

Variable	Method	Num DF	Den DF	F Value	Pr > F
DPPC	Folded F	3	4	13.27	0.0303

T-Tests