



336427
2

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO
PLANTEL CHAPULTEPEC

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico el
contenido de mi trabajo recibo

NOMBRE: Mariana

Castañeda Hernández

FECHA: 11 - Julio - 03

FIRMA: [Firma]

**PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA
CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS
DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE
VACUNAS HUMANAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

ASESOR: Q.F.B. OSVELIA GUTIÉRREZ HERRERA

TRABAJA CON
FALLA DE ORIGEN

MÉXICO D.F.

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACION DISCONTINUA

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

Agradezco a mis padres como un tributo a todo su apoyo; por sus sabios consejos, inmenso amor y comprensión; estas razones motivaron mis ganas de seguir adelante para poder llegar a ser algo especial en la vida, nunca encontrare las palabras adecuadas para poderles expresar mi agradecimiento.

Y sobre todo agradezco a mi querida hermanita Celia Margarita por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, y por su cariño y paciencia cuando más lo he necesitado.

Agradezco a mis maestros expresándoles mi profunda gratitud por darme una formación profesional al transmitirme sus conocimientos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gracias.

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

**PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO
PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE
PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO
PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	3
DEFINICIONES.....	4
OBJETIVOS.....	12
HIPÓTESIS.....	14
1 PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO.....	15
1.1 PROPÓSITO.....	15
1.2 ALCANCE.....	15
1.3 RESPONSABILIDADES.....	16
1.4 ATRIBUTOS DE MEDICIÓN.....	17
1.5 REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL.....	17
1.6 DESCRIPCIÓN.....	19
1.7 PROCEDIMIENTO.....	22

**PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS**

**TRUCO CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE

MARIANA CASTAÑEDA HERNANDEZ

1.7.1 Estandarización del Suero de ASH como Estándar de Referencia	
Interna.....	22
1.7.2 Estandarización del Suero de ASB como Estándar de Referencia	
Interna.....	23
1.7.3 Estandarización del Gel de Hidróxido de Aluminio para la	
preparación de muestras.....	24
1.7.4 Preparación del Estándar de Referencia.....	25
1.7.5 Preparación de la Muestra.....	25
1.7.6 Procedimiento.....	26
1.7.7 Linearidad del Sistema.....	26
1.7.8 Linearidad del Método.....	27
1.7.9 Precisión del Sistema (evaluada como Repetibilidad).....	28
1.7.10 Exactitud del Método.....	29
1.7.11 Precisión del Método (Repetibilidad y Reproducibilidad).....	30
1.7.11.1 Reproducibilidad ó Precisión Intermedia.....	31
1.7.11.2 Repetibilidad.....	31
1.7.12 Estabilidad de la muestra analítica del método.....	32

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

**TFSIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE

MARIANA CASTANEDA HERNÁNDEZ

1.8 DOCUMENTACIÓN APLICABLE.....	33
1.9 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN.....	33
2 PARTE TEÓRICO.....	35
2.1 GENERALIDADES DE ADYUVANTES.....	35
2.1.1 Adyuvantes por Inmunización.....	37
2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA.....	38
2.2.1 Nombre Químico de la Materia Prima.....	38
2.2.2 Fórmula Química Desarrollada.....	38
2.2.3 Fórmula Química Condensada.....	38
2.2.4 Conservación.....	38
2.3 GENERALIDADES DE PROTEÍNAS.....	39
2.3.1 Algunas Aplicaciones: Adyuvante-Proteína.....	40
2.4 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	42
2.4.1 Métodos Analíticos.....	43
2.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	44
2.5.1 Parámetros a Evaluar.....	44
2.5.2 Diagrama de Flujo.....	45

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

3 PARTE EXPERIMENTAL.....	46
3.1 VALORACIÓN.....	46
3.1.1 Reactivos, Material, Instrumentos y Equipos.....	46
3.1.2 Estandarización del Suero de ASH como Estándar de Referencia Interna.....	48
3.1.2.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	49
3.1.2.1.1 Determinación de Nitrógeno Total.....	49
3.1.2.1.2 Determinación de Nitrógeno No Proteico.....	50
3.1.3 Estandarización del Suero de ASB como Estándar de Referencia Interna.....	52
3.1.3.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	53
3.1.3.1.1 Determinación de Nitrógeno Total.....	53
3.1.3.1.2 Determinación de Nitrógeno No Proteico.....	53
3.1.4 Estandarización del Gel de Hidróxido de Aluminio para la preparación de muestras.....	54
3.1.4.1 Determinación de Hidróxido de Aluminio.....	55
3.2 ESPECIFICACIONES DE LA MATERIA PRIMA.....	56

 PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
 LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO...
 DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

3.2.1 MÉTODO ANALÍTICO.....	57
3.2.1.1 Reactivos, Material, Instrumentos y Equipos.....	57
3.2.1.2 Descripción.....	59
3.2.1.3 Ensayos de Identidad.....	60
3.2.1.4 pH.....	60
3.2.1.5 Cloruros.....	61
3.2.1.6 Sulfatos.....	62
3.2.1.7 Arsénico.....	63
3.2.1.8 Metales Pesados.....	64
3.2.1.9 Capacidad Neutralizadora de Ácido.....	65
3.2.1.10 Límites Microbianos.....	66
3.2.1.11 Valoración.....	67
3.2.1.12 Capacidad de Adsorción de Proteínas.....	67
3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	69
3.3.1 Reactivos, Material, Instrumentos y Equipos.....	69
3.3.2 LINEARIDAD DEL SISTEMA.....	71
3.3.2.1 Preparación de muestras.....	71

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ÍNDICE

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

3.3.3	PRECISIÓN DEL SISTEMA.....	75
3.3.3.1	Preparación de muestras.....	75
3.3.4	LINEARIDAD DEL MÉTODO.....	77
3.3.4.1	Preparación de muestras (placebos adicionados).....	77
3.3.4.2	Determinación Preliminar.....	79
3.3.5	EXACTITUD DEL MÉTODO.....	81
3.3.5.1	Preparación de muestras (placebos adicionados).....	81
3.3.6	PRECISIÓN DEL MÉTODO (Repetibilidad y Reproducibilidad)..	83
3.3.6.1	Preparación de muestras.....	84
3.3.6.2	Reproducibilidad.....	84
3.3.7	ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANAL. DEL MÉTODO.....	87
3.3.7.1	Preparación de muestras.....	87
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	90
4.1	RESULTADOS DE LA VALORACIÓN.....	90
4.1.1	Estandarización del suero de ASH como Estándar de Referencia Interna.....	90
4.1.2	Estandarización del suero de ASB como Estándar de Referencia Interna.....	90

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO -
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

4.1.3 Estandarización del gel de hidróxido de aluminio para la preparación de muestras.....	91
4.2 RESULTADOS DE LA MATERIA PRIMA.....	92
4.3 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO..	94
4.3.1 Linearidad del Sistema.....	94
4.3.2 Precisión del Sistema.....	100
4.3.3 Determinación Preliminar.....	102
4.3.4 Linearidad del Método.....	103
4.3.5 Exactitud del Método.....	109
4.3.6 PRECISIÓN DEL MÉTODO: Reproducibilidad.....	112
4.3.7 Estabilidad de la muestra analítica del Método.....	116
5 INFORME DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO.....	118
5.1 PROPÓSITO.....	118
5.2 RESULTADOS.....	118
5.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	120
5.4 CONCLUSIONES.....	120
CONCLUSIONES DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	121
REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	123

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
 LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO -
 DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

RELACION DE TABLAS EN EL TEXTO

TABLA 1. El porciento de recobro y el C.V. deberán estar de acuerdo con los siguientes métodos propuestos.....	30
TABLA 2. El C.V. debe cumplir con los siguientes criterios.....	31
TABLA 3. El C.V. deberá estar de acuerdo con los siguientes métodos.....	32
TABLA 4. El método debe cumplir con las siguientes determinaciones.....	33
TABLA 5. Especificaciones de la materia prima.....	56
TABLA 6. Crecimiento y Morfología en los medios de cultivo.....	66
TABLA 7. Intervalo de evaluación para la Linearidad del Sistema.....	72
TABLA 8. Concentraciones requeridas para la preparación de las muestras analíticas en la Linearidad del sistema.....	73
TABLA 9. Concentración requerida al 100% para la Precisión del sistema.....	75
TABLA 10. Concentraciones requeridas para la preparación de las muestras problema en la Linearidad del método.....	78
TABLA 11. Concentraciones requeridas para la preparación de las muestras problema en la Exactitud del método.....	81

**PROTOCOLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMÍNIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS**

TABLA 12. Preparación de muestras con las siguientes condiciones a evaluar para la Estabilidad de la muestra analítica.....	88
TABLA 13. Resultados obtenidos de la Materia Prima.....	92
TABLA 14. Linearidad del Sistema de ASH.....	94
TABLA 15. Linearidad de Sistema de ASH. Concentración teórica, concentración experimental, porciento de recobro y porciento de recobro ajustado al 100%....	95
TABLA 16. Criterios de aceptación y resultados de la Linearidad del sistema...	96
TABLA 17. Comprobación de la Linearidad del Sistema mediante el ANADEVA (Análisis de varianza).....	98
TABLA 18. Precisión del Sistema de ASH.....	100
TABLA 19. Concentración teórica, concentración experimental y porciento de recobro.....	100
TABLA 20. Determinación Preliminar de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.....	102
TABLA 21. Linearidad del Método de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.....	103

TABLA 22. Linearidad del Método de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio. Concentración teórica de ASH adsorbida, concentración experimental de ASH adsorbida, porciento de recobro y porciento de recobro ajustado al 100%.....	104
TABLA 23. Criterios de aceptación y resultados de la Linearidad del método.	105
TABLA 24. Comprobación de la Linearidad del Método mediante el ANADEV A (Análisis de varianza).....	107
TABLA 25. Exactitud del Método de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.....	109
TABLA 26. Reproducibilidad del Método para la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.....	112
TABLA 27. Parámetros y Resultados de los 12 datos (2 analistas/2 días).....	112
TABLA 28. Comprobación de la Repetibilidad (precisión intermedia) mediante el ANADEV A (Análisis de varianza).....	114
TABLA 29. Estabilidad de la muestra analítica.....	116
TABLA 30. Resultados del método analítico.....	118

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
 LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
 DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

RELACIÓN DE GRÁFICAS EN EL TEXTO

Gráfica 1. Linearidad del Sistema de la validación del método analítico.....	97
Gráfica 2. Recta de regresión calculada para la linearidad del sistema.....	97
Gráfica 3. Precisión del Sistema de la validación del método analítico.....	101
Gráfica 4. Linearidad del método de la validación del método analítico.....	105
Gráfica 5. Recta de regresión calculada para la linearidad del método.....	105
Gráfica 6. Exactitud del método al 0.25% de gel de Hidróxido de aluminio... ..	110
Gráfica 7. Exactitud del método al 1% de gel de Hidróxido de aluminio.....	110
Gráfica 8. Exactitud del método al 2.95% de gel de Hidróxido de aluminio... ..	111
Gráfica 9. Precisión del método de la validación del método analítico.....	115

**PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO ..
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS**

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

INTRODUCCIÓN

En la Industria Farmacéutica, es importante aplicar la validación del método analítico para cuantificar la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas, como parte integral del proceso de cuantificación.

El criterio más importante en la elección de un adyuvante destinado para la producción de vacunas humanas, es la bioseguridad y, en la actualidad, los únicos adyuvantes permitidos para uso humano son los compuestos de aluminio, que constan de antígenos fijados por adsorción sobre el hidróxido de aluminio, estos se caracterizan por mantener al antígeno en los tejidos por periodos más largos, favoreciendo así la respuesta inmunológica, y su principal ventaja es la de cuantificar con mayor facilidad su contenido antigénico, teniendo una buena estabilidad.

Las fuerzas de atracción electrostáticas son las responsables de la adsorción de los antígenos a los adyuvantes que contienen aluminio, esta característica esta dada porque el hidróxido de aluminio tiene la cualidad de adsorber proteínas, ya que lleva una carga positiva en presencia de electrolitos $[Al(OH)_3]$, sin embargo, forma fácilmente complejos con la carga total de los aminoácidos.

PROTOCOLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
 LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
 DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

Como los Toxoides son adsorbidos sobre el hidróxido de aluminio, la FEUM 7ª Edición, indica que el gel de hidróxido de aluminio esta contenido a una concentración del 0.3% en el producto terminado, por lo que se establece un intervalo de concentraciones en el que el hidróxido de aluminio será adecuado para su capacidad de adsorción como materia prima y como ingrediente en producto terminado; éste método analítico utiliza una cantidad conocida de estándar de ASH, el cuál se usará como un simulador del Toxoide.

El método consistirá en mezclar una cantidad en exceso conocida de ASH con una cantidad conocida de hidróxido de aluminio, para que éste adsorba toda la cantidad posible; por lo que el estándar de ASH que no sea adsorbida quedará libre y se cuantifica por el método de Biuret, y de esta manera nos permite conocer la capacidad de adsorción de proteínas del hidróxido de aluminio. La importancia de las proteínas se advierte por su capacidad para fijar diversas sustancias químicas, incluyendo numerosos iones y fármacos.

Para poder conocer la capacidad de adsorción de proteínas que tendrá el hidróxido de aluminio a diferentes concentraciones que se utilizará durante la validación, es necesario conocer la concentración de proteínas que contiene el suero de ASH que se utilizará como estándar de referencia; así como también se evaluará con suero de ASB, para saber si en un momento dado es posible utilizarla.

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

JUSTIFICACIÓN

La importancia de un adyuvante destinado para la producción de vacunas humanas, depende de su capacidad de adsorción de proteínas, por lo que es necesario demostrar experimentalmente que el método analítico propuesto, es adecuado para su propósito y si cumple de manera consistente con los criterios de aceptación predeterminados para la linealidad del sistema de medición, linealidad del método, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y estabilidad de la muestra.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

DEFINICIONES

- ◆ ANADEVA: Análisis de Varianza.
- ◆ Adyuvante: Son materiales insolubles que incorporados a una vacuna actúan manteniendo al Toxoide en los tejidos por periodos más largos, de manera que retarda la liberación del Toxoide, por lo que aumenta la respuesta inmunológica.
- ◆ Anticuerpo: Es una proteína producida por el organismo como respuesta a la presencia de un antígeno y es capaz de reaccionar de manera específica con el mismo.
- ◆ Antígeno: Es aquel agente extraño, en su gran mayoría proteínas que, cuando se introduce al organismo, es capaz de inducir la activación de anticuerpos específicos, los cuales pueden reaccionar con el antígeno.
- ◆ Calibración: Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, en ó a través de una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

PROTOCOLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDROXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

- ◆ **Documentación:** Conjunto de información que sustenta una actividad realizada.
- ◆ **DPT:** Es una suspensión estéril, blanca, de Toxoides diftérico y tetánico, y una vacuna antipertussis inactivada, adsorbidos sobre hidróxido de aluminio.
- ◆ **Electrolito:** Es una sustancia que forma una solución acuosa que conduce electricidad, lo que indica que sí hay iones presentes en ella.
- ◆ **Especificaciones:** Descripción del material, sustancia o producto, que incluye la definición de sus propiedades y características, con las tolerancias de variación de los parámetros de calidad.
- ◆ **Especificidad:** Capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.
- ◆ **Estabilidad de la Muestra Analítica:** Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo pequeñas pero deliberadas modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como: diferentes temperaturas, lotes de reactivo, columnas, tipos de empaque, condiciones ambientales, etc. Es un indicativo de la confiabilidad de métodos durante su uso normal.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

- ◆ Estándar de ASB: Estándar suero de Albúmina Sérica Bovina, el cuál se utiliza como simulador del Toxoide.
- ◆ Estándar de ASH: Estándar suero de Albúmina Sérica Humana, el cuál se utiliza como simulador del Toxoide.
- ◆ Exactitud: De un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de las muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia de interés. Es para saber que tan cercano es un resultado contra el valor real.
- ◆ Gel: Preparación semisólida, que contiene él o los principios activos y aditivos, incorporados en forma sólida en un líquido que puede ser agua, alcohol o aceite, de tal manera que se forma una red de partículas atrapadas en la fase líquida.
- ◆ Inmunidad Activa: Es la que provoca en el individuo una respuesta inmunológica consistente especialmente en la producción de anticuerpos específicos contra el agente infeccioso. Por otra parte las vacunas en general son activas durante un tiempo prolongado (7 a 10 años).

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

- ◆ Imunidad Pasiva: Es la que se logra mediante la administración de anticuerpos específicos, como generalmente están contenidos en el suero sanguíneo (antisueros, inmunosueros o simplemente sueros). Los cuales son de poca duración (8 a 12 meses).
- ◆ Intervalo: Concentraciones incluidas entre la concentración superior e inferior del analito (incluyendo estas), para las cuales se ha demostrado que el método analítico es preciso, exacto y lineal.
- ◆ Linealidad: La linealidad de un sistema o método analítico es la habilidad para asegurar que los resultados analíticos son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.
- ◆ Marbete: Es la leyenda o leyendas que todo producto farmacéutico registrado en la Secretaría de Salubridad y Asistencia, debe llevar de acuerdo con los requisitos que exigen las diversas disposiciones que dicte dicha Secretaría.
- ◆ Materia Prima: Sustancia de cualquier origen que se usa para la elaboración de medicamentos o fármacos.
- ◆ Muestra: Porción del material a evaluar.

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

- ◆ **Muestra Analítica:** Es cualquier muestra preparada para su cuantificación, la cuál debe de conservar su integridad fisicoquímica.
- ◆ **Placebo ó Placebos:** Es la preparación con todos los excipientes de la forma farmacéutica, pero sin el principio activo.
- ◆ **Placebo adicionado ó Placebos adicionados:** Es una preparación con todos los excipientes de la forma farmacéutica más una cantidad conocida del principio activo.
- ◆ **Polvo Liofilizado:** Es un polvo homogéneo y libre de partículas extrañas, con muy baja humedad residual.
- ◆ **Precisión:** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes análisis de una muestra homogénea del producto o de una referencia. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.
- ◆ **Principio Activo o Analito:** Componente específico de una muestra, a medir en un análisis.

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

- ◆ **Protocolo:** Es un documento que establece el tipo de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios de aceptación preestablecidos de manera consistente.
- ◆ **Pureza:** Grado en el cual las materias primas, los productos intermedios y a granel, están exentos de material extraño.
- ◆ **Repetibilidad:** Es la precisión de un método analítico expresado como la concordancia obtenida entre las determinaciones independiente realizadas bajo las mismas condiciones (mismo equipo, mismos aparatos y técnicas), por un solo analista, el mismo día y con determinaciones independientes.
- ◆ **Reproducibilidad ó Precisión Intermedia:** Es la variación existente dentro de los laboratorios en diferentes días, analistas, equipos, etc.
- ◆ **Respuesta Inmunológica:** Es la presentación de los antígenos ante un agente extraño al organismo.
- ◆ **Solución Estándar de Referencia:** Solución estándar de concentración conocida, que en validación de métodos se utiliza para analizar las muestras y placebos.

PROTOKOLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCION DE PROTEINAS DEL GEL DE HIDROXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS HUMANAS

- ◆ **Solución Stock:** Solución concentrada de la sustancia de interés a partir de la cual se preparan otras soluciones (muestras) de menor concentración.

- ◆ **Sustancia ó Estándar de Referencia:** Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con la sustancia en evaluación.

- ◆ **Sustancia ó Estándar de Referencia Primaria:** Sustancia que es reconocida por tener la más alta calidad de pureza muy cercana al 100%, cuyas propiedades se aceptan sin referencia a otras sustancias.

- ◆ **Sustancia ó Estándar de Referencia Secundaria:** Sustancia de pureza más baja que puede estandarizarse contra una sustancia de referencia primaria.

- ◆ **Sustancia ó Estándar de Referencia Interna:** Sustancia obtenida de materias primas de alta calidad farmacopéica y cuyos parámetros se han comprobado mediante análisis efectuados por el propio laboratorio usuario.

- ◆ **Td:** Es una suspensión estéril, blanca o de color blanco grisáceo de Toxoides diftérico y tetánico, adsorbidos sobre hidróxido de aluminio.

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

- ◆ **Toxina ó Exotoxina:** Son agentes bacterianos que producen sustancias tóxicas de tipo proteico, estas proteínas son secretadas por las bacterias, las cuales producen las enfermedades o hipertermia.
- ◆ **Toxoide ó Anatoxina:** Las toxinas se inactivan o se detoxifican mediante el empleo de formaldehído y calor, pierden su poder tóxico sin perder su capacidad de producir una respuesta inmunológica.
- ◆ **Vacuna:** Se aplica el nombre general de vacunas a todo agente extraño capaz de producir inmunidad activa, especialmente provoca la formación de anticuerpos específicos al ser administrados en el organismo.
- ◆ **Validación de Métodos Analíticos:** Es el proceso por medio del cual queda establecido, por estudios experimentales de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar experimentalmente que el método analítico propuesto, es capaz de cuantificar la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas, si este es adecuado para su propósito y si cumple de manera consistente con los criterios de aceptación predeterminados para la linealidad del sistema de medición, linealidad del método, precisión (repetibilidad y reproducibilidad), exactitud y estabilidad de la muestra.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Elaborar el protocolo de validación para cuantificar la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio, asegurando que indique todos los requerimientos y parámetros necesarios, así como sus respectivos criterios de aceptación.
- ◆ Efectuar la estandarización del suero de ASH (albúmina sérica humana) como estándar de referencia interna.
- ◆ Efectuar la estandarización del suero de ASB (albúmina sérica bovina) como estándar de referencia interna.
- ◆ Efectuar la estandarización del gel de hidróxido de aluminio para la preparación de muestras.
- ◆ Proponer un método analítico para cuantificar la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas, como parte del programa de validación.

HIPÓTESIS

- ◆ La cantidad de proteínas fijados por adsorción sobre el hidróxido de aluminio oscila entre 16 a 26mg de ASH/ml.
- ◆ Conforme se aumenta la concentración de hidróxido de aluminio, mayor será la capacidad de adsorción de proteínas.
- ◆ Los resultados analíticos individuales obtenidos experimentalmente en la validación del método analítico, cuando el procedimiento se aplica repetidamente, serán gradualmente concordantes contra el valor de referencia.
- ◆ Los resultados analíticos individuales obtenidos experimentalmente en la validación del método analítico, cuando el procedimiento se aplica repetidamente, serán concordantes contra el valor de referencia.
- ◆ Los resultados analíticos obtenidos experimentalmente en la validación del método analítico, bajo pequeñas pero deliberadas modificaciones de las condiciones normales de operación, serán gradualmente reproducibles contra el valor de referencia.

<p>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas</p>	<p>Fecha de Validación:</p>	<p>Página: 1 de 20</p>
--	-----------------------------	------------------------

1. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas.

1.1 PROPÓSITO

Comprobar que el método analítico para la Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas, es adecuado para su propósito y si cumple de manera consistente con los criterios de aceptación predeterminados para linealidad y precisión del sistema, linealidad y precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad) exactitud y estabilidad de la muestra.

1.2 ALCANCE

Este documento aplica en la validación del método analítico para la Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas, como parte del programa integral de validación.

<p>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas</p>	<p>Fecha de Validación:</p>	<p>Página: 2 de 20</p>
--	-----------------------------	------------------------

1.3 RESPONSABILIDADES

- ◆ Es responsabilidad del Supervisor de Control de Calidad verificar que se tengan las condiciones adecuadas durante el tiempo que tome la validación.
- ◆ Es responsabilidad del Supervisor de Control de Calidad asegurar la disponibilidad del equipo, material, reactivos y personal que requieran para la validación.
- ◆ Es responsabilidad del Jefe de Control de Calidad verificar los resultados obtenidos durante el estudio de la validación.
- ◆ Es responsabilidad de los Químicos Analistas la ejecución de las actividades indicadas en el protocolo.
- ◆ Es responsabilidad del Supervisor de Control de Calidad la elaboración del informe de validación.
- ◆ Es responsabilidad de Aseguramiento de Calidad la toma de muestras que se requieran.
- ◆ Es responsabilidad del Jefe y/o Supervisor de Control de Calidad que los instrumentos que se van a usar estén calibrados y el equipo que se va a usar esté calificado.
- ◆ Es responsabilidad del Responsable Sanitario verificar que este protocolo se cumpla y dar su aprobación final.

<p>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas</p>	<p>Fecha de Validación:</p>	<p>Página: 3 de 20</p>
--	-----------------------------	------------------------

1.4 ATRIBUTOS DE MEDICIÓN

- ◆ Linearidad del Sistema de Medición
- ◆ Precisión del Sistema (Repetibilidad)
- ◆ Linearidad del Método de Medición
- ◆ Exactitud del Método
- ◆ Precisión del Método (Repetibilidad)
- ◆ Precisión del Método (Reproducibilidad)
- ◆ Estabilidad de la muestra analítica del Método

1.5 REACTIVOS, INSTRUMENTOS, EQUIPOS Y MATERIAL

Reactivos

- ◆ Agua purificada
- ◆ Gel de hidróxido de aluminio al 3%, S.R. estéril
- ◆ Hidróxido de sodio R.A.
- ◆ Suero de albúmina sérica bovina (ASB) R.A.
- ◆ Suero de albúmina sérica humana (ASH) al 10%, S.R. estéril
- ◆ Sulfato de cobre R.A.
- ◆ Tartrato de potasio sódico R.A.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas	Fecha de Validación:	Página: 4 de 20
--	----------------------	-----------------

Instrumentos y Equipos

- ◆ Espectrofotómetro, marca MILTON ROY, modelo 20C
- ◆ Balanza Analítica, marca CHYO
- ◆ Refrigerador, marca NIETO
- ◆ Centrifuga, marca BECKMAN, modelo TJ-6
- ◆ Baño Maria, marca GRANT, modelo W-38

Material

- ◆ Bureta graduada de 5, 10ml.
- ◆ Celdas de 1cm
- ◆ Espátula
- ◆ Gradilla metálica
- ◆ Matraz volumétrico de 25, 50, 100, 200 y 250ml.
- ◆ Perilla
- ◆ Pipeta graduada de 10ml, Pipeta volumétrica de 1, 2 y 5ml.
- ◆ Piseta
- ◆ Termómetro
- ◆ Tubos de ensayo de 15x150mm, Tubos para centrifuga
- ◆ Vaso de precipitado de 100ml, 250ml.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 5 de 20

1.6 DESCRIPCIÓN

El gel de hidróxido de aluminio es un adyuvante que forma parte en la formulación de las vacunas humanas, el cuál lleva una carga positiva en presencia de electrolitos $[Al(OH)_3]$, sin embargo, forma fácilmente complejos con la carga total de los aminoácidos, esta característica esta dada porque el hidróxido de aluminio tiene la cualidad de adsorber proteínas y sus unidades componentes (aminoácidos), por lo que las fuerzas de atracción electrostáticas son las responsables de la adsorción de los antígenos a los adyuvantes que contienen aluminio. El grado de adsorción depende de la naturaleza y la concentración del antígeno, de la presencia de sales e iones y del pH de la mezcla resultante.

El método para cuantificar la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio, es un método que pertenece a la categoría III, que es aquella que agrupa los métodos que miden características de desempeño de las materias primas o productos.

Para esta categoría está indicado evaluar la repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad; sin embargo, considerando que es un método proporcionado por el proveedor, es necesario evaluar al método, por lo que se aplicará el estudio evaluando la linealidad y precisión del sistema, así como la linealidad del método.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 6 de 20

Este método consiste en mezclar una cantidad en exceso conocida de suero estándar de albúmina sérica humana con una cantidad conocida de hidróxido de aluminio, para que éste adsorba toda la cantidad posible; por lo que el estándar de ASH que no sea adsorbida quedará libre y se cuantifica por el método de Biuret, y de esta manera nos permite conocer la capacidad de adsorción de proteínas del hidróxido de aluminio.

En el método espectrofotométrico de absorción se basa en la absorbancia de una muestra, la cual es directamente proporcional a la concentración de la muestra absorbente, es decir, indica cuánta luz se absorbe a una longitud de onda dada. La cantidad de luz que absorbe la muestra analítica presenta un máximo de absorbancia visible a 540nm, es directamente proporcional al color que se produce (longitudes de onda no absorbidas), de color púrpura.

El método indica utilizar estándar de ASH, proteína de alto costo, por lo que durante la validación se probará con estándar de ASB que es de menor costo. Si los resultados entre las dos albúminas son similares, podrá sustituirse la ASH por la ASB.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 7 de 20

La cantidad de proteínas (mg) adsorbidas por el hidróxido de aluminio (ml) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{mg ASH/ml} = \frac{(A \text{ St} - A \text{ Mta}) \times \text{FD St} \times C}{A \text{ St} \times \text{FD Mt} \times \text{Vol Mta}}$$

Donde:

A St: Absorbancia de la preparación de la solución estándar

A Mta: Absorbancia de la solución de la muestra

FD St: Factor de dilución de la preparación del estándar (25)

FD Mta: Factor de dilución de la preparación de la muestra (25)

C: Concentración de la solución estándar original en mg/ml

Vol Mta: Volumen de la muestra utilizado

<p>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas</p>	<p>Fecha de Validación:</p>	<p>Página: 8 de 20</p>
--	-----------------------------	------------------------

1.7 PROCEDIMIENTO

1.7.1 Estandarización del Suero de ASH como Estándar de Referencia Interna

El método para la determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio, es un método espectrofotométrico; por lo que se utiliza un estándar de referencia. En este caso no se cuenta con un estándar primario, ni secundario de referencia de suero de albúmina humana, por lo que será necesario estandarizar un suero de referencia, de acuerdo a la FEUM 7ª edición.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La albúmina sérica humana estandarizada será seleccionada como estándar de referencia interno debe cumplir con todas las especificaciones.

En el caso de la determinación de pureza, el C.V. deberá ser $\leq 1\%$ y en el caso de la determinación de humedad el C.V. deberá ser $\leq 2\%$.

TRABAJA CON
FECHA DE ORIGEN

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 9 de 20

1.7.2 Estandarización del Suero de ASB como Estándar de Referencia Interna

El método para la determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio, es un método que utiliza como referencia suero de albúmina humana, sin embargo, en la evaluación de la estabilidad de la muestra se evaluará también con albúmina bovina, la cuál es también fácil de preparar, para saber si en un momento determinado es posible utilizar una u otra indistintamente, por lo que será necesario estandarizar como sustancia de referencia la albúmina bovina a utilizar, de acuerdo a la FEUM 7ª edición.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La albúmina sérica bovina estandarizada será seleccionada como estándar de referencia interno debe cumplir con todas las especificaciones.

En el caso de la determinación de pureza, el C.V. deberá ser $\leq 1\%$ y en el caso de la determinación de humedad el C.V. deberá ser $\leq 2\%$.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 10 de 20

1.7.3 Estandarización del Gel de Hidróxido de Aluminio para la preparación de muestras

El gel de hidróxido de aluminio se utilizará a diferentes concentraciones por lo que es necesario conocer su concentración inicial con la mayor exactitud posible, por lo que será necesario realizar el ensayo por quintuplicado por cuatro analistas diferentes. El resultado promedio de los 20 datos obtenidos será la concentración de referencia a utilizar, de acuerdo a la FEUM 7ª edición.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La materia prima estandarizada será seleccionada como estándar de referencia interno debe cumplir con todas las especificaciones.

En el caso de la determinación de pureza, el C.V. deberá ser $\leq 1\%$ y en el caso de la determinación de humedad el C.V. deberá ser $\leq 2\%$.

<p>PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas</p>	<p>Fecha de Validación:</p>	<p>Página: 11 de 20</p>
--	-----------------------------	-------------------------

1.7.4 Preparación del Estándar de Referencia

- ◆ Depositar 1ml de la solución estándar de ASH con una concentración al 10% (100mg/ml) a un matraz volumétrico de 25ml, mezclar y aforar con agua. Esta solución contiene una concentración de 4mg/ml de ASH.
- ◆ Pesar exactamente 1g de estándar de ASB al 100% a un matraz volumétrico de 10ml, mezclar y aforar con agua, para obtener una concentración al 10% (100mg/ml); transferir una alícuota de 1ml de esta solución a un matraz volumétrico de 25ml, mezclar y aforar con agua. Esta solución contiene una concentración de 4mg/ml de ASB.

1.7.5 Preparación de la Muestra

- ◆ Depositar 2ml de gel de hidróxido de aluminio en un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 1ml de la solución estándar de ASH con una concentración al 10% (100mg/ml), mezclar y aforar con agua. Esta solución contiene una concentración de 4mg/ml de ASH.
- ◆ Pesar exactamente 1g de estándar de ASB al 100% a un matraz volumétrico de 10ml, mezclar y aforar con agua. Depositar 2ml de gel de hidróxido de aluminio en un matraz volumétrico de 25ml, transferir una alícuota de 1ml de esta solución, mezclar y aforar con agua. Esta solución contiene una concentración de 4mg/ml de ASB.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 12 de 20

1.7.6 Procedimiento

Posteriormente dejar reposar por 24 horas en refrigeración con agitación esporádica. Centrifugar a 3000rpm durante 25 minutos, del sobrenadante tomar 5ml y depositarlo en un tubo de ensayo, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret, y calentar en baño maria a 50°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente.

Obtener la absorbancia de la preparación de referencia y de la preparación de la muestra a la longitud de onda de 540nm, empleando celdas de 1cm y preparar un blanco de reactivos, para ajustar el aparato a cero.

1.7.7 Linealidad del Sistema

La linealidad de un sistema es la habilidad para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs respuesta medida), utilizando cuando menos 5 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis cuando menos por duplicado para cada dilución o concentración.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 13 de 20

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependerá del propósito del método; deberá estar incluida la concentración seleccionada como 100% (4mg/ml).

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Coefficiente de correlación $r \geq 0.99$

Coefficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$

Coefficiente de variación C.V. $\leq 1.5\%$

1.7.8 Linearidad del Método

Se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 concentraciones diferentes de la sustancia de interés (placebo analítico), cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado, por un mismo analista en las mismas condiciones de operación. El margen quedará de acuerdo a las especificaciones del producto, pero se recomienda hacerlo del 40 al 120% sobre todo para productos nuevos ya que posteriormente este método será usado en la evaluación del proceso de fabricación.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 14 de 20

Las concentraciones de los placebos adicionados deben ser las adecuadas para que, utilizando el método propuesto, las concentraciones de las soluciones finales a analizar estén dentro del intervalo de la linealidad del sistema, incluyendo siempre la correspondiente al 100%.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Cantidad adicionada vs cantidad recuperada:

Pendiente $m \approx 1$, Ordenada al origen $b \approx 0$

Coefficiente de correlación $r \geq 0.99$

Coefficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$

Coefficiente de variación los C.V. a cada nivel y los globales de todo el intervalo de la linealidad deben estar de acuerdo con lo especificado en la Tabla 1 (pag.30).

1.7.9 Precisión del Sistema (evaluada como repetibilidad)

Es el grado de concordancia entre resultados individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras de una solución homogénea.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 15 de 20

Usualmente se expresa en términos de D.E. o C.V. Se determina el análisis por sextuplicado de una misma solución de referencia (una muestra analítica), correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Coefficiente de variación C.V. $\leq 3\%$

1.7.10 Exactitud del Método

Es la concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el porciento de recobro obtenido del análisis de muestra a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

Emplear en esta prueba los resultados obtenidos en la linealidad del método de la concentración al 100% (4mg/ml) siempre y cuando los porcentajes recuperados se calculen en base a la cantidad adicionada.

Se determina de cuando menos 6 placebos adicionados de manera independiente, con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100% (4mg/ml), utilizando el método propuesto. Haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas	Fecha de Validación:	Página: 16 de 20
--	----------------------	------------------

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

TABLA 1. El porciento de recobro y el C.V. deberán estar de acuerdo con los siguientes métodos propuestos.

MÉTODOS	PORCIENTO DE RECOBRO	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
Cromatográficos	98 - 102%	≤ 2 %
Titrimétricos	98 - 102%	≤ 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	97 - 103%	≤ 3 %

1.7.11 Precisión del Método (Repetibilidad y Reproducibilidad)

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

La precisión del método se evalúa determinando la Precisión Intermedia ó Reproducibilidad y/o Repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas	Fecha de Validación:	Página: 17 de 20
--	----------------------	------------------

1.7.11.1 Reproducibilidad ó Precisión Intermedia

Se determina de una muestra homogénea del producto cercana al 100% (4mg/ml) de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

1.7.11.2 Repetibilidad

Se determina analizando un mínimo de 9 muestras, que abarquen el intervalo del método, es decir 3 concentraciones/3 análisis de cada una (linealidad del método), ó también se determina analizando un mínimo de 6 muestras al 100% (4mg/ml) de la concentración de prueba.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

TABLETA 2. El C.V. debe cumplir con los siguientes criterios.

MÉTODOS	Precisión Intermedia	Repetibilidad
Cromatográficos	$\leq 2 \%$	$\leq 2 \%$
Químicos y Espectrofotométricos	$\leq 3 \%$	$\leq 2 \%$

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 18 de 20

1.7.12 Estabilidad de la muestra analítica del Método

Es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo pequeñas pero deliberadas modificaciones de las condiciones normales de operación; tales como diferentes temperaturas, analistas, días, lotes de reactivos, condiciones ambientales, tipos de empaque, etc.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos en diferentes condiciones.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La muestra se establece si el I.C. para la diferencia de la media de los resultados de la muestra con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero y/o la magnitud del efecto no exceda los siguientes porcentajes con respecto al 100% (4mg/ml).

TABLA 3. El C.V. deberá estar de acuerdo con los siguientes métodos.

MÉTODOS	C.V.
Cromatográficos	± 2 %
Titrimétricos	± 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	± 3 %

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 19 de 20

1.8 DOCUMENTACIÓN APLICABLE

- ◆ Método de Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas
- ◆ Copia de los certificados de calibración del Espectrofotómetro
- ◆ Copia de los informes de calibración de la Balanza Analítica
- ◆ Copia de los informes de calibración de la Bureta Graduada

1.9 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

TABLA 4. El método debe cumplir con las siguientes determinaciones.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN
<i>LINEARIDAD DEL SISTEMA</i>	Coeficiente de correlación $r \geq 0.99$ Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$ Coeficiente de variación $CV \leq 1.5$
<i>LINEARIDAD DEL MÉTODO</i>	Pendiente (m) ≈ 1 Ordenada (b) ≈ 0 Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$ Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$; de acuerdo a la naturaleza de la muestra, el CV puede incrementarse (1% más)

 PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
 LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
 DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas	Fecha de Validación:	Página: 20 de 20
--	----------------------	------------------

TABLA 4. Continuación.

<i>PRECISIÓN DEL SISTEMA</i>	Coeficiente de variación $CV \leq 1.5$
<i>PRECISIÓN DEL MÉTODO</i> ♦ Repetibilidad ♦ Reproducibilidad	♦ Coeficiente de correlación $r \geq 0.99$ Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$ Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$ ♦ Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$
<i>EXACTITUD DEL MÉTODO</i>	Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$
<i>ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA DEL MÉTODO</i>	Porcentaje de recobro 97 – 103%

Fin del Protocolo de Método Analítico

 PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
 LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
 DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

2. PARTE TEÓRICO

2.1 GENERALIDADES DE ADYUVANTES

Uno de los primeros adyuvantes, desarrollado por Freund hace más de 50 años, el cual está compuesto por una emulsión de aceite en agua con micobacterias muertas (adyuvante de Freund), que no se ha llegado a utilizar en la práctica clínica. Sin embargo, el adyuvante sin las micobacterias se usó en la vacunación antigripal en el Reino Unido. En la actualidad, los únicos adyuvantes que se utilizan son los compuestos de aluminio (hidróxido de aluminio y/o fosfato de aluminio).¹⁹

De acuerdo a la FEUM, la OMS y la FDA, son permisibles cantidades no mayores de 1.5mg de hidróxido de aluminio por dosis de vacuna.¹⁰

El criterio más importante, sin lugar a dudas, para la elección de un adyuvante destinado a vacunas humanas es la bioseguridad y, en la actualidad, los únicos adyuvantes permitidos para uso humano son los compuestos de aluminio,¹³ pero existen otros adyuvantes, algunos de los cuales están en fase de evaluación como los componentes bacterianos naturales y sintéticos.¹⁹

El índice de sedimentación del hidróxido de aluminio diluido a una concentración de 6mg/ml, es grandemente superior al resto de los adyuvantes comerciales compuestos de aluminio. La estabilidad del gel y la resuspendabilidad de las vacunas que contienen el hidróxido de aluminio siguen siendo satisfactorias incluso durante periodos muy largos del excedente (3-4 años) a temperatura ambiente. La estabilidad del gel sin embargo, es afectada seriamente si se somete a congelación, ya que puede destruir totalmente su naturaleza.⁹

Las vacunas humanas constan de antígenos fijados por adsorción sobre compuestos de aluminio,¹⁹ y su principal ventaja es la de cuantificar con mayor facilidad su contenido antigénico, además la vacuna tiene buena estabilidad.⁹

Las fuerzas de atracción electrostáticas son las responsables de la adsorción de los antígenos a los adyuvantes que contienen aluminio,² esta característica esta dada porque el hidróxido de aluminio tiene la cualidad de adsorber proteínas y sus unidades componentes (aminoácidos) ya que lleva una carga positiva en presencia de electrolitos $[Al(OH)_3]$, sin embargo, forma fácilmente complejos con la carga total de los aminoácidos.⁹ El grado de adsorción depende de la naturaleza y la concentración del antígeno, de la presencia de sales e iones y del pH de la mezcla resultante.¹⁵

2.1.1 Adyuvantes por Inmunización

Los adyuvantes de aluminio actúan mediante tres mecanismos:¹⁹

- I. Mantienen al antígeno atrapado en el sitio de la administración de la vacuna, permitiendo un estímulo inmune prolongado.
- II. Retarda la liberación masiva del antígeno por periodos más largos, que podría dar lugar a la tolerancia inmune, y causar una respuesta inflamatoria local que atrae a macrófagos y a otras células presentadoras de antígenos (CPA).
- III. Aumentan la respuesta inmunológica al transportar y liberar lentamente los antígenos específicos.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA

2.2.1 Nombre Químico de la Materia Prima

Aluminio, hidróxido de, gel

2.2.2 Fórmula Química Desarrollada

$\text{Al}(\text{OH})_3$

2.2.3 Fórmula Química Condensada

AlH_3O_3 P.M. 78.00

2.2.4 Conservación

En envases bien cerrados.

2.3 GENERALIDADES DE PROTEÍNAS

Las proteínas y sus unidades componentes (aminoácidos) se fijan fácilmente por adsorción sobre el hidróxido de aluminio para formar complejos. Estos complejos, son estas mismas adsorciones, o sea, la unión proteína-adyuvante, y su especificidad es determinada por el tipo de aminoácido, ya que los aminoácidos se dividen por su carga total.⁹

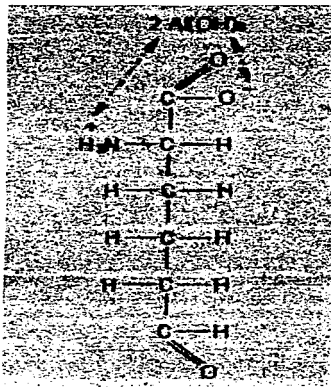
Como los Toxoides (DPT y Td) son adsorbidos con el hidróxido de aluminio, de acuerdo con la FEUM 7ª Edición, indica que el gel de hidróxido de aluminio esta contenido a una concentración del 0.3% en el producto terminado, por lo que se establece un intervalo de concentraciones en el que el hidróxido de aluminio será adecuado para su capacidad de adsorción como materia prima y como ingrediente en producto terminado, por lo que este método utiliza una cantidad conocida de suero estándar de ASH, por lo que se utilizará como simulador del Toxoide.

La albúmina sérica humana (ASH) se expende en frascos y contiene 50ml, equivalente al 20% p/v de suero de ASH, contiene no más de 14mg de sodio como impureza por gramo de albúmina sérica.

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

La albúmina sérica bovina se expende en frascos, contiene 5g de polvo liofilizado equivalente al 97% de ASB pura. Disolver el liofilizado con 5ml de agua purificada para obtener una concentración final de 970mg/ml de suero de ASB, agitar hasta disolver. La solución debe ser transparente y libre de partículas visibles.

2.3.1 Algunas Aplicaciones: Adsorción Adyuvante-Proteína⁹



ÁCIDO GLUTÁMICO:

Este aminoácido es fuertemente ácido, por lo que está cargado negativamente.

Como el hidróxido de aluminio no adsorbe proteínas específicas, éste adyuvante forma fácilmente complejos con las cargas totales de esta proteína.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

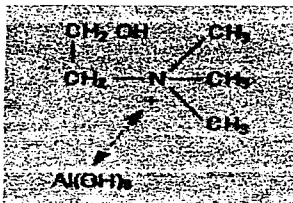
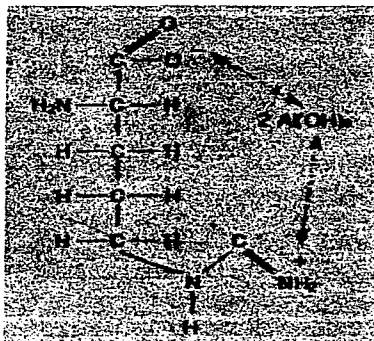
PARTE TEÓRICO

GENERALIDADES DE PROTEÍNAS

MARIANA CASTANEDA HERNÁNDEZ

ARGININA:

Este aminoácido es fuertemente básico, por lo que está cargado positivamente.



COLINA:

Este aminoácido es fuertemente básico, por lo que está cargado positivamente.

Estos aminoácidos se fijan fácilmente por adsorción sobre el hidróxido de aluminio, con sus cargas totales.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

2.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

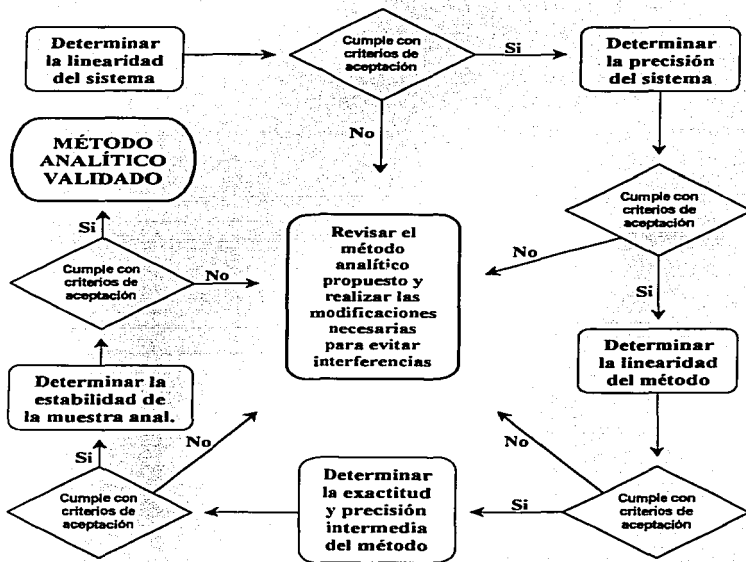
La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio, que el desarrollo de las características del método, reúnen los requerimientos de las aplicaciones analíticas que son linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad, reproducibilidad) y especificidad.

2.5.1 Parámetros a Evaluar

- ◆ Linearidad del Sistema
- ◆ Precisión del Sistema: Repetibilidad
- ◆ Linearidad del Método
- ◆ Exactitud del Método
- ◆ Precisión del Método: Repetibilidad
- ◆ Precisión del Método: Reproducibilidad (Precisión Intermedia)
- ◆ Estabilidad de la Muestra Analítica del Método

2.5.2 Diagrama de Flujo

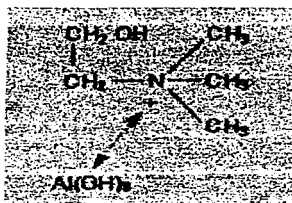
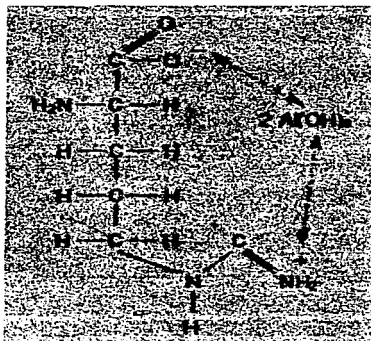
Diagrama de pasos para la Validación de un método analítico.



PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

ARGININA:

Este aminoácido es fuertemente básico, por lo que está cargado positivamente.

**COLINA:**

Este aminoácido es fuertemente básico, por lo que está cargado positivamente.

Estos aminoácidos se fijan fácilmente por adsorción sobre el hidróxido de aluminio, con sus cargas totales.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

FALTAN
LAS
PÁGINAS

42

A

43

2.5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

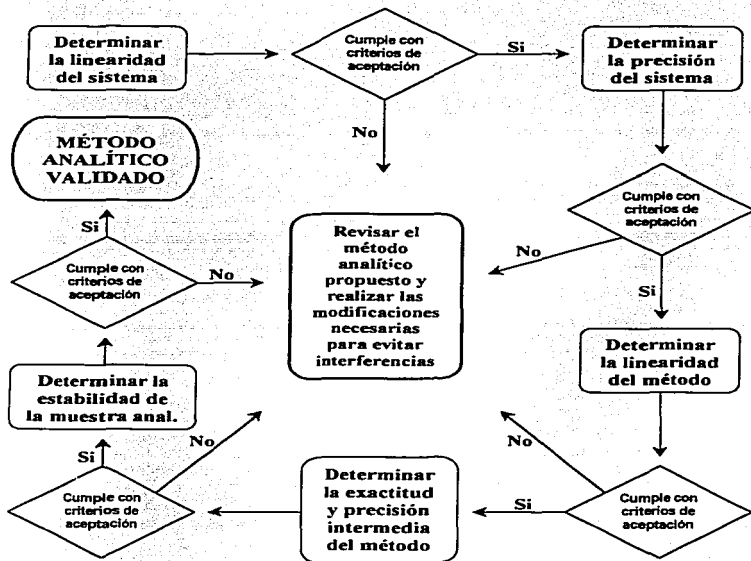
La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio, que el desarrollo de las características del método, reúnen los requerimientos de las aplicaciones analíticas que son linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad, reproducibilidad) y especificidad.

2.5.1 Parámetros a Evaluar

- ◆ Linearidad del Sistema
- ◆ Precisión del Sistema: Repetibilidad
- ◆ Linearidad del Método
- ◆ Exactitud del Método
- ◆ Precisión del Método: Repetibilidad
- ◆ Precisión del Método: Reproducibilidad (Precisión Intermedia)
- ◆ Estabilidad de la Muestra Analítica del Método

2.5.2 Diagrama de Flujo

Diagrama de pasos para la Validación de un método analítico.



PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 VALORACIÓN

3.1.1 Reactivos, Material, Instrumentos y Equipos

Reactivos

- ◆ Acetato de amonio R.A.
- ◆ Ácido acético al 97%, S.R.
- ◆ Ácido bórico R.A.
- ◆ Ácido clorhídrico al 98%, S.R.
- ◆ Ácido sulfúrico al 97%, S.R.
- ◆ Ácido tricloroacético R.A.
- ◆ Agua purificada
- ◆ Albúmina sérica humana (ASH) y albúmina sérica bovina (ASB) estéril
- ◆ Ditizona R.A.
- ◆ Etanol absoluto al 96%, S.R.
- ◆ Etilendiamino tetra-acetato de sodio (EDTA) R.A.
- ◆ Gel de hidróxido de aluminio al 3%, S.R. estéril
- ◆ Hidróxido de sodio R.A.
- ◆ Indicador de tashiro (azul de metileno-rojo de metilo) R.A.
- ◆ Sulfato de cobre R.A.
- ◆ Sulfato de potasio R.A.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

PARTE EXPERIMENTAL

VALORACIÓN

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

Material

- ◆ Bureta graduada de 5, 10, 50ml.
- ◆ Embudo de tallo corto
- ◆ Espátula
- ◆ Magnetos
- ◆ Matraz Kjeldahl de 100ml.
- ◆ Matraz volumétrico de 25 y 50ml.
- ◆ Matraz Erlenmeyer de 250ml.
- ◆ Papel Whatman No. 5
- ◆ Parrilla eléctrica con agitación
- ◆ Perilla
- ◆ Perlas de vidrio
- ◆ Pipeta volumétrica de 2, 8 y 10ml.
- ◆ Pipeta graduada de 10ml.
- ◆ Piseta
- ◆ Soporte universal

Instrumentos y Equipos

- ◆ Balanza Analítica, marca CHYO
- ◆ Refrigerador, marca NIETO
- ◆ Microdestilador, marca LABCONCO, modelo 65000
- ◆ Parrilla eléctrica con 5 quemadores

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

3.1.2 Estandarización del Suero de ASH como Estándar de Referencia Interna

El método para la determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio, es un método espectrofotométrico; por lo que se utiliza un estándar de referencia. En este caso no se cuenta con un estándar primario, ni secundario de referencia de suero de albúmina humana, por lo que será necesario estandarizar un suero de referencia, de acuerdo a la FEUM 7ª edición.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La albúmina sérica humana estandarizada será seleccionada como estándar de referencia interno debe cumplir con todas las especificaciones.

En el caso de la determinación de pureza, el C.V. deberá ser $\leq 1\%$ y en el caso de la determinación de humedad el C.V. deberá ser $\leq 2\%$.

3.1.2.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

3.1.2.1.1 Determinación de Nitrógeno Total

Preparar una solución stock de la muestra por analizar, a una dilución de 2:25. Depositar en un matraz Kjeldahl de 100ml, 2ml de la solución stock. Agregar 1g de una mezcla (1:9) de sulfato de cobre y sulfato de potasio. Adicionar 2ml de ácido sulfúrico concentrado. Depositar en el matraz algunas perlas de vidrio para evitar proyecciones. Someter la muestra a calentamiento, aumentando la temperatura gradualmente hasta alcanzar la abullición y mantener esta última constante. Digerir por lo menos durante una hora, hasta que la solución presente un color verde claro y ausencia total de sustancias carbonizadas. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Depositar la muestra cuantitativamente a un destilador por arrastre de vapor y proceder a la destilación, adicionando 15ml de hidróxido de sodio al 40% m/v. Recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer que contenga 5ml de solución de ácido bórico al 4% m/v, adicionada de un indicador que vire en el intervalo de pH entre 3 y 7. Colectar aproximadamente 75ml del destilado.

Titular con solución valorada 0.05N de ácido clorhídrico usando unas gotas de indicador de Tashiro, hasta vire del indicador a un ligero color rosa. Paralelamente, correr un blanco de reactivos, cuyo consumo de ácido clorhídrico debe restarse al consumo del problema.

MARIANA CASTANEDA HERNÁNDEZ

3.1.2.1.2 Determinación de Nitrógeno No Proteico

Depositar en un matraz volumétrico de 25ml, 5ml de muestra y aforar con ácido tricloroacético al 25% m/v. Mezclar y dejar reposar 10 minutos. Centrifugar o filtrar con papel Whatman No.5 para eliminar el precipitado que se forma. Tomar 2ml del sobrenadante y pasarlos a un matraz Kjeldahl de 100ml. Agregar 1g de una mezcla (1:9) de sulfato de cobre y sulfato de potasio. Adicionar 2ml de ácido sulfúrico concentrado. Depositar en el matraz algunas perlas de vidrio para evitar proyecciones. Someter la muestra a calentamiento, aumentando la temperatura gradualmente hasta alcanzar la abullición y mantener esta última constante. Digerir por lo menos durante una hora, hasta que la solución presente un color verde claro y ausencia total de sustancias carbonizadas. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Depositar la muestra cuantitativamente a un destilador por arrastre de vapor y proceder a la destilación, adicionando 15ml de hidróxido de sodio al 40% m/v. Recibir el destilado en un matraz Erlenmeyer que contenga 5ml de solución de ácido bórico al 4% m/v, adicionada de un indicador que vire en el intervalo de pH entre 3 y 7. Colectar aproximadamente 75ml del destilado. Titular con solución valorada 0.05N de ácido clorhídrico usando unas gotas de indicador de Tashirol, hasta vire del indicador a un ligero color rosa. Paralelamente, correr un blanco de reactivos, cuyo consumo de ácido clorhídrico debe restarse al consumo del problema.

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

CÁLCULOS**Nitrógeno Total.**

Un mililitro de solución 0.05N de ácido clorhídrico, equivale a 0.7005mg de nitrógeno y a 4.3765mg de proteína (N x 6.25).

Nitrógeno No Proteico.

$$\text{g de Nitrógeno no proteico/100ml} = \frac{\text{ml de HCl consumidos} \times \text{N del HCl} \times 0.014 \times 25}{\text{ml de muestra} \times 5} \times 100$$

Para obtener el contenido de proteínas de una muestra que contiene nitrógeno no proteico, aplicar la fórmula siguiente:

$$\text{g de proteínas/100ml} = [(\text{g N}_2 \text{ total/100ml}) - (\text{g N}_2 \text{ no proteico/100ml})] \times 6.25$$

3.1.3 Estandarización del Suero de ASB como Estándar de Referencia Interna

El método para la determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio, es un método que utiliza como referencia suero de albúmina humana, sin embargo, en la evaluación de la estabilidad de la muestra se evaluará también con albúmina bovina, la cual es también fácil de preparar, para saber si en un momento determinado es posible utilizar una u otra indistintamente, por lo que será necesario estandarizar como sustancia de referencia la albúmina bovina a utilizar, de acuerdo a la FEUM 7ª edición.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La albúmina sérica bovina estandarizada será seleccionada como estándar de referencia interno debe cumplir con todas las especificaciones.

En el caso de la determinación de pureza, el C.V. deberá ser $\leq 1\%$ y en el caso de la determinación de humedad el C.V. deberá ser $\leq 2\%$.

3.1.3.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

3.1.3.1.1 Determinación de Nitrógeno Total

Realizar la técnica como se encuentra indicada en el punto 3.1.2.1.1

3.1.3.1.2 Determinación de Nitrógeno No Proteico

Realizar la técnica como se encuentra indicada en el punto 3.1.2.1.2

3.1.4 Estandarización del Gel de Hidróxido de Aluminio para la preparación de muestras

El gel de hidróxido de aluminio se utilizará a diferentes concentraciones por lo que es necesario conocer su concentración inicial con la mayor exactitud posible, por lo que será necesario realizar el ensayo por quintuplicado por cuatro analistas diferentes. El resultado promedio de los 20 datos obtenidos será la concentración de referencia a utilizar, de acuerdo a la FEUM 7ª edición.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

La materia prima estandarizada será seleccionada como estándar de referencia interno debe cumplir con todas las especificaciones.

En el caso de la determinación de pureza, el C.V. deberá ser $\leq 1\%$ y en el caso de la determinación de humedad el C.V. deberá ser $\leq 2\%$.

3.1.4.1 Determinación de Hidróxido de Aluminio

Agitar bien la muestra y transferir 20ml a un matraz Erlenmeyer de 250ml, adicionar 25ml de EDTA disódico 0.1M y 10ml de una mezcla de volúmenes iguales de solución 15.5% m/v de acetato de amonio y ácido acético 2M. Calentar a ebullición durante 2 minutos, enfriar y agregar 50ml de etanol absoluto y 3ml de una solución recientemente preparada al 0.025% m/v de ditizona en etanol absoluto. Titular el exceso de EDTA disódico con solución 0.1M de sulfato de zinc hasta que haya un cambio de azul verdoso a violeta rojizo.

CÁLCULOS

Cada mililitro de la solución 0.1M de EDTA disódico equivale a 0.0078g de hidróxido de aluminio.

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

3.2 ESPECIFICACIONES DE LA MATERIA PRIMA

TABLA 5. Especificaciones de la materia prima.

PRUEBA	ESPECIFICACIÓN
DESCRIPCIÓN	Suspensión blanca, viscosa. Al mantenerse en reposo pueden separarse en pequeñas cantidades de líquido
ENSAYOS DE IDENTIDAD	A) Positiva B) Positiva
pH	Entre 5.5 y 8.0
CLORUROS	Máximo 4.7%
SULFATOS	Máximo 0.8%
ARSÉNICO	Máximo 10ppm
METALES PESADOS	Máximo 8.3ppm
CAPACIDAD NEUTRALIZADORA DE ÁCIDO	Mínimo 65%
LÍMITES MICROBIANOS	Ausencia de E. coli. La cuenta total de microorganismos aerobios no es mayor de 100UFC/ml
VALORACIÓN	De 2.91 a 3.21% p/p
CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS	De 16 a 26mg de ASH/ml

La técnica se sigue de acuerdo a la FEUM 7ª edición.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.1 MÉTODO ANALÍTICO

3.2.1.1 Reactivos, Material, Instrumentos y Equipos

Reactivos

- ◆ Acetato de amonio R.A.
- ◆ Ácido clorhídrico al 98%, S.R.
- ◆ Ácido nítrico al 98%, S.R.
- ◆ Ácido sulfúrico al 97%, S.R.
- ◆ Agua purificada
- ◆ Cromato de potasio R.A.
- ◆ Etanol absoluto al 96%, S.R.
- ◆ Etilendiamino tetra-acetato de sodio (EDTA) R.A.
- ◆ Gel de hidróxido de aluminio al 3%, S.R. estéril
- ◆ Hidróxido de amonio R.A.
- ◆ Hidróxido de calcio R.A.
- ◆ Hidróxido de sodio R.A.
- ◆ Nitrato de plata R.A.
- ◆ Sulfato de zinc R.A.
- ◆ Sulfuro de hidrógeno R.A.
- ◆ Sulfuro de sodio R.A.
- ◆ Trióxido de arsénico R.A.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

Material

- ◆ Aparato para la determinación de arsénico
- ◆ Asa estéril
- ◆ Bureta graduada de 10ml, 50ml.
- ◆ Cajas de petrí
- ◆ Cápsula de porcelana
- ◆ Desecador
- ◆ Embudo de tallo corto
- ◆ Espátula
- ◆ Gradilla metálica
- ◆ Matraz Erlenmeyer de 50 y 250ml.
- ◆ Matraz volumétrico de 25, 50 y 1000ml.
- ◆ Mechero
- ◆ Mortero con pistilo
- ◆ Papel filtro, papel tomasol
- ◆ Parrilla eléctrica
- ◆ Perilla
- ◆ Pipeta graduada de 1, 5 y 10ml.
- ◆ Pipeta volumétrica de 1, 2 y 5ml.
- ◆ Piseta
- ◆ Tubo Nessler
- ◆ Tubos de ensayo de 15x150mm
- ◆ Tubos de 1cm

PROTOCOLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCION DE PROTEINAS DEL GEL DE HIDROXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Medios de Cultivo

- ◆ Medio caldo lactosado, BIOXON
- ◆ Medio caldo selenito-cisteína, BIOXON
- ◆ Medio caldo tetracionato, BIOXON
- ◆ Medio Agar Levine Azul de Metileno y/o Agar McConkey, BIOXON

Instrumento y Equipo

- ◆ Espectrofotómetro, marca MILTON ROY, modelo 20C
- ◆ Balanza Analítica, marca CHYO
- ◆ Refrigerador, marca NIETO
- ◆ Centrifuga, marca BECKMAN, modelo TJ-6
- ◆ Baño Maria, marca GRANT, modelo W-38
- ◆ Estufa, marca ISHER SCIENTIFIC, modelo 630G

3.2.1.2 DESCRIPCIÓN

Suspensión blanca, viscosa. Al mantenerse en reposo pueden separarse en pequeñas cantidades de líquido.

3.2.1.3 ENSAYOS DE IDENTIDAD

- A. Pasar 1g de la muestra a un matraz cuyo tapón esté equipado con un tubo de prueba (tubo de vidrio cuya punta ha sido sumergida en SR de hidróxido de calcio). Agregar 5ml de ácido clorhídrico 3N al matraz e insertar inmediatamente el tapón. Hay formación de vapores en el interior del matraz y un precipitado en el tubo de prueba.
- B. La solución remanente del Ensayo de Identidad A, da reacción positiva a las pruebas de identidad para aluminio.
MGA 0511. Identidad para Aluminio. Las soluciones de sales de aluminio tratadas con solución de hidróxido de amonio 6N producen un precipitado blanco gelatinoso, insoluble en un exceso de solución 6N de hidróxido de amonio. Al adicionar hidróxido de sodio 1N ó SR de sulfuro de sodio se produce un precipitado blanco gelatinoso soluble en un exceso del reactivo utilizado.

3.2.1.4 pH

MGA 0701. Entre 5.5 y 8.0. Medir el pH potenciométricamente.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.1.5 CLORUROS

No más del 4.7% calculado con referencia al contenido de hidróxido de aluminio indicado en el marbete. Pasar una cantidad de la muestra equivalente a 0.6g de hidróxido de aluminio a una cápsula de porcelana, agregar 0.1ml de SR de cromato de potasio y 25ml de agua; agitar y agregar solución de nitrato de plata 0.1N hasta obtener coloración rosa claro persistente. No se utilizan más de 8ml de solución de nitrato de plata 0.1N.

MGA 0161. En un tubo Nessler disolver la cantidad de sustancia por ensayar, especificada en la monografía respectiva, con 30 ó 40ml de agua y si la sustancia es una solución, se le agrega el agua necesaria para obtener dichos volúmenes. Neutralizar la solución con ácido nítrico, utilizando como indicador papel tornasol. En otro tubo Nessler se prepara la solución de referencia que sirve de comparación, con la cantidad de solución de ácido clorhídrico 0.02N especificada en la monografía respectiva y se le adiciona agua a un volumen de 30 ó 40ml. Agregar 1ml de ácido nítrico y 1ml de SR de nitrato de plata, tanto al tubo de la muestra como al de referencia y enseguida agua hasta 50ml. Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos, protegidos de la luz. Observar y comparar que la turbidez producida por la sustancia por ensayar no sea mayor que la de la solución de referencia especificada en la monografía.

3.2.1.6 SULFATOS

No más del 0.8% calculado con referencia al contenido de hidróxido de aluminio indicado en el marbete. Pasar una cantidad de la muestra equivalente a 0.05g de hidróxido de aluminio a un matraz volumétrico de 250ml y agregar 5ml de ácido clorhídrico 3N y calentar hasta disolución. Enfriar y llevar con agua al volumen, filtrar si es necesario. Una alícuota de 20ml del filtrado, no contiene más sulfatos que los correspondientes a 0.2ml de ácido sulfúrico 0.02N.

MGA 0861. Para disolver la cantidad de la sustancia indicada en la monografía específica del producto, utilizar de 30 a 40ml de agua, para los casos en que la muestra se encuentra en solución, adicionar la suficiente cantidad de agua para hacer un volumen total de 30 a 40ml, si es necesario neutralizar la solución al papel tomasol son ácido clorhídrico. Adicionar 1ml de ácido clorhídrico 3N, 3ml de SR de cloruro de bario y suficiente agua para hacer un volumen de 50ml. Mezclar la solución, dejar reposar durante 10 minutos y comparar en forma visual el precipitado obtenido, con el producido por una solución de referencia que contenga el volumen de solución 0.02N de ácido sulfúrico indicado en la monografía especificada del producto, tratado de la misma forma que la muestra. El precipitado obtenido con la solución de la muestra, no debe ser mayor que el producido en la solución de referencia.

3.2.1.7 ARSÉNICO

Para compuestos inorgánicos. No más de 10ppm calculada con referencia al contenido de hidróxido de aluminio indicado en el marbete.

MGA 0111. Preparación de la solución de referencia de arsénico. Transferir 132mg de trióxido de arsénico, previamente pulverizado y secado a 105°C durante una hora, a un matraz volumétrico de 1000ml, disolver en 5ml de solución 1:5 (m/v) de hidróxido de sodio; neutralizar con ácido sulfúrico 2N, agregar 10ml más de ácido sulfúrico 2N y llevar al volumen con agua recientemente hervida y fría, mezclar. Conservar esta solución en refrigeración y usar dentro de un periodo no mayor de 30 días. Transferir 10ml de la solución anterior a un matraz volumétrico de 1000ml, agregar 10ml de ácido sulfúrico 2N y llevar al aforo con agua recientemente hervida y fría, mezclar. Cada mililitro de esta solución de referencia contiene el equivalente a 1µg de arsénico. Conservar esta solución en recipientes de vidrio con tapón esmerilado y usar dentro de un periodo no mayor a 3 días.

Preparación de la muestra. Si la cantidad de muestra no se especifica en la monografía correspondiente, calcular la cantidad de muestra necesaria utilizando la siguiente fórmula: $G = 3.0/L$; en donde, G es la cantidad de muestra necesaria en gramos; L es el límite de arsénico en partes por millón (ppm).

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

3.2.1.8 METALES PESADOS

Método I. No más de 8.3ppm calculadas con referencia al contenido de hidróxido de aluminio indicado en el marbete. Disolver una cantidad de la muestra equivalente a 0.24g de hidróxido de aluminio en 10ml de ácido clorhídrico 3N con ayuda de calentamiento, filtrar si es necesario y diluir con agua a 25ml.

MGA 0561. Preparación de Referencia. En un tubo Nessler de 50ml, tomar una alícuota de 2ml de solución estándar de plomo (20 μ g), y diluir con agua a 25ml. ajustar con ácido acético 1N o hidróxido de amonio 6N a un pH entre 3.0 y 4.0, empleando papel indicador externo, diluir con agua a 40ml y mezclar.

Preparación de la muestra. En un tubo Nessler de 50ml, colocar 25ml de la solución preparada para la prueba según se indica en la monografía individual o bien empleando el volumen de ácido designado, cuando éste se especifica en la monografía individual, disolver y diluir con agua a 25ml la cantidad en gramos, de la sustancia a probar calculada por la fórmula: $2.0/(1000L)$; en donde, L es el límite de metales pesados, en porcentaje. Ajustar con ácido acético 1N ó hidróxido de amonio 6N a un pH 3.0 y 4.0 empleando papel indicador de rango estrecho como indicador externo, diluir a 40ml con agua y mezclar.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

Preparación del control. En un tercer tubo de Nessler de 50ml colocar 25ml de una solución preparada según se indica para la preparación de la muestra y agregar 2ml de solución estándar de plomo. Ajustar con ácido acético 1N ó hidróxido de amonio 6N a pH entre 3.0 y 4.0, empleando papel indicador de rango estrecho como indicador externo, diluir a 40ml con agua y mezclar.

Procedimiento. A cada uno de los tres tubos que contienen la preparación de referencia, preparación de la muestra y la preparación del control, agregar 10ml de SR de sulfuro de hidrógeno; mezclar, dejar reposar 5 minutos y hacer la comparación observando los tubos de arriba hacia abajo sobre un fondo blanco. El color de la muestra es igual o menos oscuro que el de la solución de referencia de plomo y la intensidad del color de la preparación de referencia.

3.2.1.9 CAPACIDAD NEUTRALIZADORA DE ÁCIDO

No menos del 65% de los miliequivalentes teóricos. Efectuar el cálculo a partir de los resultados obtenidos en la Valoración. Cada miligramo de hidróxido de aluminio tiene la capacidad neutralizadora teórica de 0.0385mEq de ácido.

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

3.2.1.10 LÍMITES MICROBIANOS

Ausencia de *E. coli*. La cuenta total de microorganismos aerobios no es mayor de 100UFC/ml.

MGA 0571. **Identificación de *Escherichia coli*.** Inocular 10ml ó 10g de muestra en 90ml de medio caldo lactosado e incubar. Resembrar 1ml de cultivo a los siguientes medios de enriquecimiento: 10ml de medio caldo selenito-cisteína, 10ml de medio caldo tetratonato. Mezclar e incubar de 18 a 24 horas.

Aislamiento de *Escherichia coli*. A partir del medio caldo lactosado, aislar resembrado por estria cruzada el medio Agar Levine Azul de Metileno ó Agar McConkey. Observar el crecimiento, si la morfología colonial no corresponde con la descrita en la Tabla 1, la muestra cumple el requisito de ausencia de *Escherichia coli*.

TABLA 6. Crecimiento y Morfología en los medios de cultivo.

MEDIO DE CULTIVO	MORFOLOGÍA COLONIAL	MORFOLOGÍA MICROSCÓPICA
Agar McConkey	Colonias grandes rosas rojas rodeadas de una zona de precipitación	Bacilos Gram Negativos
Agar Levine Azul de Metileno	Colonias pequeñas azul-negro con brillo metálico de color verde	Bacilos Gram Negativos

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.2.1.11 VALORACIÓN

MGA 0999. **Titulación complejométrica.** Agitar bien la muestra y transferir 20ml a un matraz Erlenmeyer de 250ml, adicionar 25ml de EDTA disódico 0.1M y 10ml de una mezcla de volúmenes iguales de solución 15.5% m/v de acetato de amonio y ácido acético 2M. Calentar a ebullición durante 2 minutos, enfriar y agregar 50ml de etanol absoluto y 3ml de una solución recientemente preparada al 0.025% m/v de ditizona en etanol absoluto. Titular el exceso de EDTA disódico con solución 0.1M de sulfato de zinc hasta que haya un cambio de azul verdoso a violeta rojizo. Cada mililitro de la solución 0.1M de EDTA disódico equivale a 0.0078g de hidróxido de aluminio.

3.2.1.12 CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS

De 16 a 26mg de ASH/ml. Preparar una solución de trabajo de suero estándar de ASH a una concentración aproximada de 10% (100mg/ml).

Posteriormente depositar por duplicado 2ml de muestra a un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 1ml de la solución de trabajo de ASH, mezclar y aforar con agua. Dejar reposar por 24 horas en refrigeración con agitación esporádica.

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

Centrifugar a 3000rpm durante 25 minutos, del sobrenadante tomar 5ml y depositarlo en un tubo de ensayo, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret y calentar en baño maría a 50°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y leer a 540nm. Preparar un blanco de reactivos y correr al mismo tiempo una preparación de la solución estándar de ASH a una dilución de 1:25.

La cantidad de proteínas (mg) adsorbidas por el hidróxido de aluminio (ml) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{mg ASH/ml} = \frac{(A_{St} - A_{Mta}) \times FD_{St} \times C}{A_{St} \times FD_{Mt} \times Vol_{Mta}}$$

Donde:

- A St: Absorbancia de la preparación de la solución estándar
A Mta: Absorbancia de la solución de la muestra
FD St: Factor de dilución de la preparación del estándar (25)
FD Mta: Factor de dilución de la preparación de la muestra (25)
C: Concentración de la solución estándar original en mg/ml
Vol Mta: Volumen de la muestra utilizado

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.3.1 Reactivos, Instrumento, Equipos y Material

Reactivos

- ◆ Agua purificada
- ◆ Gel de hidróxido de aluminio al 3%, S.R. estéril
- ◆ Hidróxido de sodio R.A.
- ◆ Suero de albúmina sérica bovina (ASB) R.A.
- ◆ Suero de albúmina sérica humana (ASH) al 10%, S.R. estéril
- ◆ Sulfato de cobre R.A.
- ◆ Tartrato de potasio sódico R.A.

Instrumentos y Equipos

- ◆ Espectrofotómetro, marca MILTON ROY, modelo 20C
- ◆ Balanza Analítica, marca CHYO
- ◆ Refrigerador, marca NIETO
- ◆ Centrifuga, marca BECKMAN, modelo TJ-6
- ◆ Baño María, marca GRANT, modelo W-38

Material

- ◆ Bureta graduada de 5, 10ml.
- ◆ Celdas de 1cm
- ◆ Espátula
- ◆ Gradilla metálica
- ◆ Matraz Erlenmeyer de 50ml.
- ◆ Matraz volumétrico de 25, 50, 100, 200 y 250ml.
- ◆ Perilla
- ◆ Pipeta graduada de 10ml.
- ◆ Pipeta volumétrica de 1, 2 y 5ml.
- ◆ Piseta
- ◆ Termómetro
- ◆ Tubos de ensayo de 15x150mm.
- ◆ Tubos para centrifuga
- ◆ Vaso de precipitado de 100 y 250ml.

3.3.2 LINEARIDAD DEL SISTEMA

El objetivo de este estudio es verificar que el sistema sea lineal y reproducible. La linealidad se determina realizando el análisis de cuando menos 5 concentraciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo el análisis por triplicado de cada concentración.

3.3.2.1 Preparación de muestras

Para la preparación de las muestras se utilizará únicamente el suero estándar de ASH, considerando los siguientes dos aspectos:

a) Definición de la cantidad que se considera como el 100%:

De acuerdo con la especificación de la Materia Prima del Gel de Hidróxido de Aluminio indica preparar una solución de trabajo de ASH a una concentración aproximada al 10%, posteriormente para su análisis se hace una dilución de 1:25.

b) Intervalo de evaluación:

Para establecer el intervalo de evaluación de las muestras analíticas es necesario considerar la cantidad que se toma como el 100%, por lo que será del 35-130%. Por lo tanto se evalúa por duplicado en las siguientes 7 concentraciones: 40, 55, 70, 85, 100, 115 y 130%.

Una vez definido el 100% y el intervalo de evaluación, las muestras se preparan de la siguiente manera; considerando que 4mg/ml se considerará como el 100% tenemos que, para las otras concentraciones serán de:

TABLA 7. Intervalo de evaluación para la Linearidad del Sistema.

NIVEL (%)	CONCENTRACIÓN DE ASH REQUERIDA EN LA MUESTRA ANALÍTICA (mg/ml)
40	1.6
55	2.2
70	2.8
85	3.4
100	4.0
115	4.6
130	5.2

Para poder llegar a estas concentraciones se requiere preparar una solución stock de una concentración X que nos permita dosificar estas concentraciones en un volumen adecuado de trabajo. Por lo que la solución stock deberá tener una concentración de 50mg/ml. Este stock se prepara tomando de la solución estándar de ASH al 10% (100mg/ml), a una dilución de 12.5:25; por lo que la concentración teórica de la solución stock es de 50mg/ml.

Sin embargo, es necesario considerar que la concentración real del estándar de ASH es de 9.932% de acuerdo a la estandarización realizada (Ver punto 4.1, pag.90), por lo tanto se requiere realizar el ajuste correspondiente con el dato de la concentración real, para tener la concentración requerida de 50mg/ml.

Por lo que en realidad la solución stock se prepara a una dilución de 12.6:25. Para obtener cada una de las concentraciones requeridas de muestras analíticas, estas se preparan colocando en matraces volumétricos de 25ml, la cantidad de solución stock se encuentra indicada en la siguiente tabla:

TABLA 8. Concentraciones requeridas para la preparación de las muestras analíticas en la Linealidad del sistema.

NIVEL (%)	VOLUMEN DE SOLUCIÓN STOCK* (ml)	CONCENTRACIÓN STOCK (mg/ml)	CONCENTRACIÓN FINAL EN EL MATRAZ DE PRUEBA (mg/ml)
40	0.8	50	1.6
55	1.1	50	2.2
70	1.4	50	2.8
85	1.7	50	3.4
100	2.0	50	4.0
115	2.3	50	4.6
130	2.6	50	5.2

* Estos volúmenes serán medidos con bureta calibrada de 5ml y con división mínima de 0.1ml

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para cada nivel de concentración se añaden los volúmenes indicados de solución stock a matraces volumétricos de 25ml, cada uno de manera independiente y aforar con agua, para posteriormente ser sometidos al análisis por triplicado.

Posteriormente tomar 5ml de muestra y depositarlo en un tubo de ensayo, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret, calentar en baño maría a 60°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y leer a 540nm.

Preparar un blanco de reactivos, para ajustar el aparato a cero.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Coefficiente de correlación $r \geq 0.99$

Coefficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$

Coefficiente de variación C.V. $\leq 1.5\%$

3.3.3 PRECISIÓN DEL SISTEMA

El objetivo de este estudio es el de verificar el grado de concordancia entre resultados individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a muestras de una solución homogénea. Se determina el análisis por sextuplicado de una misma solución de referencia (una muestra analítica), correspondiente al 100% establecido en la linealidad del sistema.

3.3.3.1 Preparación de muestras

Preparar las muestras de igual manera como se prepara la concentración al 100% para Linealidad del Sistema (Ver punto 3.3.2.1, pag.71) y realizar 6 análisis. Se utiliza la misma solución stock de concentración de 50mg/ml de ASH:

TABLA 9. Concentración requerida al 100% para la Precisión del sistema.

NIVEL (%)	VOLUMEN DE SOLUCIÓN STOCK* (ml)	CONCENTRACIÓN STOCK (mg/ml)	CONCENTRACIÓN FINAL EN EL MATRAZ DE PRUEBA (mg/ml)
100	2.0	50	4.0

* Este volumen será medido con bureta calibrada de 5ml y con división mínima de 0.1ml

Estos volúmenes de solución stock se colocan en matraces volumétricos de 25ml, cada uno de manera independiente y aforar con agua para posteriormente ser analizados por sextuplicado. Posteriormente tomar 5ml de muestra y depositarlo en un tubo de ensayo, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret, calentar en baño maría a 60°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y leer a 540nm. Preparar un blanco de reactivos, para ajustar el aparato a cero.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Coefficiente de variación C.V. \leq 1.5%

3.3.4 LINEARIDAD DEL MÉTODO

El objetivo de éste estudio es verificar que el método sea lineal y reproducible. La linealidad se determina a partir de placebos adicionados de cuando menos 3 concentraciones diferentes de la sustancia de interés, cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado, por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

3.3.4.1 Preparación de muestras (placebos adicionados)

En este caso en particular la prueba que se le realiza al hidróxido de aluminio como materia prima, mide una característica de desempeño ó cualidad propia de él, como lo es su capacidad de adsorción de proteínas, por lo que no mide componentes, ni impurezas y por lo tanto, no es posible adicionar ó cargar muestras, con algún componente X. Sin embargo, la preparación de muestras se deberá a la cualidad del hidróxido de aluminio de adsorber proteínas, y a las diferentes concentraciones en las que está presente el hidróxido de aluminio como materia prima y como componente en producto terminado.

El hidróxido de aluminio como materia prima tiene una concentración aproximada del 3%, y de acuerdo a la técnica descrita en la FEUM 7ª Edición, indica que el gel de hidróxido de aluminio esta contenido en una concentración del 0.3% en el producto terminado, por lo que de acuerdo a estos datos se establece un intervalo de concentraciones en el que el hidróxido de aluminio será adecuado en su capacidad de adsorción como materia prima y como ingrediente en producto terminado. Este intervalo incluye las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.95%.

Se cuenta con un gel de hidróxido de aluminio estandarizado con una concentración del 2.95% para cubrir el intervalo se realizan las siguientes diluciones llevándolo con agua, que se encuentra indicada en la siguiente tabla:

TABLA 10. Concentraciones requeridas para la preparación de las muestras problema en la Linealidad del método.

CONCENTRACIÓN REQUERIDA (%)	FACTOR DE DILUCIÓN (ml)	DILUCIÓN: VOL $Al(OH)_3$ / VOL TOTAL (ml/ml)	CONCENTRACIÓN FINAL DE GEL DE $Al(OH)_3$ (%)
0.25	0.85:10	17/200	0.250
0.50	1.72:10	43/250	0.507
1.00	3.4:10	34/100	1.003
2.00	6.8:10	68/100	2.006
2.95	Sin dilución	Sin diluir	2.95

3.3.4.2 Determinación preliminar

Se realiza una determinación preliminar de la capacidad de adsorción de proteínas de las diferentes concentraciones del gel de hidróxido de aluminio a utilizar: 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.95% v/v.

Una vez que se cuenta con las diferentes concentraciones del gel de hidróxido de aluminio, se realiza el análisis para determinar la capacidad de adsorción de proteínas de cada una de ellas por sextuplicado.

Los datos obtenidos de estas pruebas se utilizan como referencia para conocer los recobros de las pruebas subsiguientes.

Las muestras para la linealidad del método se toman directamente de cada una de las 5 concentraciones preparadas de hidróxido de aluminio y se someten al análisis por triplicado.

Posteriormente depositar 2ml de muestra en un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 1ml de la solución de trabajo de ASH, mezclar y aforar con agua. Dejar reposar por 24 horas en refrigeración con agitación esporádica.

Centrifugar las muestras a 3000rpm durante 25 minutos, del sobrenadante tomar 5ml y depositarlo en un tubo de ensayo, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret, y calentar en baño maría a 60°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y leer a 540nm.

Preparar un blanco de reactivos, para ajustar el aparato a cero; y correr al mismo tiempo una solución estándar de ASH a una dilución de 1:25.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Coefficiente de correlación $r \geq 0.99$

Coefficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$

Coefficiente de variación C.V. $\leq 3.0\%$ (de acuerdo a la naturaleza de la muestra, el C.V. puede incrementarse 1% más).

3.3.5 EXACTITUD DEL MÉTODO

El objetivo de éste estudio es verificar la concordancia entre los valores obtenidos experimentalmente y el valor de referencia. Se determina de cuando menos 6 placebos de manera independiente con la cantidad necesaria de gel de hidróxido de aluminio para obtener las concentraciones de 0.25, 1.0 y 2.95% v/v, haciendo el análisis en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

3.3.5.1 Preparación de muestras (placebos adicionados).

La preparación de las muestras se realiza conforme a lo indicado en Linearidad del método (Ver punto 3.3.4.1, pag.77), con la particularidad de que para exactitud se preparan 6 muestras del mismo lote de Gel de hidróxido de aluminio para cada concentración y se analizan de manera individual.

TABLA 11. Concentraciones requeridas para la preparación de las muestras problema en la Exactitud del método.

CONCENTRACIÓN REQUERIDA (%)	FACTOR DE DILUCIÓN (m)	DILUCIÓN: VOL $Al(OH)_3$ / VOL TOTAL (ml/ml)	CONCENTRACIÓN FINAL DE GEL DE $Al(OH)_3$ (%)
0.25	0.85:10	17/200	0.250
1.00	3.4:10	34/100	1.003
2.95	Sin dilución	Sin diluir	2.95

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

Posteriormente depositar 2ml de muestra en un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 1ml de la solución de trabajo de ASH, mezclar y aforar con agua. Dejar reposar por 24 horas en refrigeración con agitación esporádica. Centrifugar las muestras a 3000rpm durante 25 minutos, del sobrenadante tomar 5ml y depositarlo en un tubo de ensayo, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret y calentar en baño maría a 60°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y leer a 540nm.

Preparar un blanco de reactivos, para ajustar el aparato a cero; y correr al mismo tiempo una solución estándar de ASH a una dilución de 1:25.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

Porcentaje de recuperación: 97-103%

$CV \leq 3.0\%$

PROTOCOLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCION DE PROTEINAS DEL GEL DE HIDROXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.3.6 PRECISIÓN DEL MÉTODO (Repetibilidad y Reproducibilidad)

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto.

La precisión del método se evalúa determinando la Precisión Intermedia ó Reproducibilidad y/o Repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

La repetibilidad se determina analizando un mínimo de 9 muestras, que abarquen el intervalo del método, es decir 3 concentraciones/3 análisis de cada una (linealidad del método), ó también se determina analizando un mínimo de 6 muestras al 100% de la concentración de prueba.

La reproducibilidad se determina de una muestra homogénea del producto, cercana al 100% de la concentración teórica, analizada cuando menos por dos analistas, en dos días diferentes y por triplicado.

3.3.6.1 Preparación de muestras.

Repetibilidad.

Para su determinación es posible omitir la preparación de muestras específicas para su determinación, ya que la repetibilidad se considera evaluada con los datos obtenidos durante la determinación de la linealidad del método, esto debido a que las condiciones y preparación de las muestras para repetibilidad son iguales para ambos parámetros analíticos.

Reproducibilidad ó Precisión Intermedia.

Para su determinación se utilizan muestras del mismo lote de gel de hidróxido de aluminio. Se proporciona a cada analista una muestra homogénea de gel de hidróxido de aluminio al 2.95% v/v que será la muestra a analizar.

3.3.6.2 Reproducibilidad.

Para ejecutar ésta prueba cada analista realizará el análisis por triplicado en dos días diferentes, de la misma muestra.

Las muestras para la precisión intermedia se toman del mismo lote de gel de hidróxido de aluminio y se someten al análisis.

Posteriormente depositar 2ml de muestra en un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 1ml de la solución de trabajo de ASH, mezclar y aforar con agua. Dejar reposar por 24 horas en refrigeración con agitación esporádica.

Centrifugar las muestras a 3000rpm durante 25 minutos, del sobrenadante tomar 5ml y depositarlo en un tubo de ensaye, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret y calentar en baño maria a 60°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y leer a 540nm.

Preparar un blanco de reactivos, para ajustar el aparato a cero; y correr al mismo tiempo una solución estándar de ASH a una dilución de 1:25.

CRITERIO DE ACEPTACION

- ◆ Repetibilidad: Coeficiente de Variación $CV \leq 2\%$ en los datos de linealidad del método
- ◆ Precisión Intermedia: Coeficiente de Variación $CV \leq 3\%$

El resultado del ANADEVA debe cumplir con las hipótesis nulas "a" y "d":

- ◆ Hipótesis nula "a": El método analítico es reproducible por los analistas
- ◆ Hipótesis nula "d": El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista

Para cumplir con las hipótesis nulas la $F_{calculada}$ debe ser menor a la de F_{tablas} en el ANADEVA.

En el caso de no cumplir con el criterio de aceptación del ANADEVA, deberá realizarse el cálculo correspondiente para determinar la fuente de variación entre analistas y días.

3.3.7 ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALITICA DEL MÉTODO

La evaluación de la estabilidad de la muestra analítica de un método analítico tiene como objetivo determinar el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra, bajo pequeñas pero deliberadas modificaciones de las condiciones normales de operación; tales como diferentes temperaturas, analistas, días, lotes de reactivos, condiciones ambientales, etc.

Se procede de acuerdo a la determinación de reproducibilidad, ya que en éste parámetro se evalúa el método variando las condiciones ambientales. En éste caso no será necesario preparar muestras específicas para su determinación, se tomarán los datos obtenidos en la reproducibilidad.

3.3.7.1 Preparación de muestras

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de 3 muestras con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer por un tiempo determinado en diferentes condiciones. En éste caso se seleccionan tres lotes de gel de hidróxido de aluminio al 2.95% v/v.

Posteriormente depositar 2ml de muestra en un matraz volumétrico de 25ml, adicionar 1ml de la solución de trabajo de ASH, mezclar y aforar con agua. Dejar reposar por 24 horas en refrigeración con agitación esporádica. Centrifugar las muestras a 3000rpm durante 25 minutos, del sobrenadante tomar 5ml y depositarlo en un tubo de ensayo, adicionar 10ml del Reactivo de Biuret y calentar en baño maría a 60°C durante 15 minutos. Enfriar a temperatura ambiente y leer a 540nm.

Preparar un blanco de reactivos, para ajustar el aparato a cero; y correr al mismo tiempo una solución estándar de ASH a una dilución de 1:25.

Para ejecutar ésta prueba las muestras se preparan por triplicado, con las siguientes condiciones a evaluar:

TABLA 12. Preparación de muestras con las siguientes condiciones a evaluar para la Estabilidad de la muestra analítica.

CODIGO	CONDICIÓN
A	Utilizar estándar de suero de ASB en lugar de ASH
B	Tiempo de reposo: 72 horas/refrigeración sin agitación
C	Técnica descrita pero sin refrigeración

Transcurrido el tiempo, se analizan las muestras bajo las mismas condiciones de operación (equipo, instrumentos y analista).

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

- ◆ Coeficiente de Variación C.V. $\leq 3\%$

El resultado del ANADEVA debe cumplir con las hipótesis nulas "a" y "d":

- ◆ Hipótesis nula "a": El método analítico es reproducible por los analistas
- ◆ Hipótesis nula "d": El método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista

Para cumplir con las hipótesis nulas la $F_{calculada}$ debe ser menor a la de F_{tablas} en el ANADEVA.

En el caso de no cumplir con el criterio de aceptación del ANADEVA, deberá realizarse el cálculo correspondiente para determinar la fuente de variación entre analistas y días.

Estabilidad de la Muestra Analítica:

- ◆ El intervalo de confianza (IC) para la diferencia de la media de la muestra almacenada con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero.
- ◆ El porcentaje de recobro promedio esta entre 97-103%.

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 RESULTADOS DE LA VALORACIÓN

4.1.1 Estandarización del suero de ASH como Estándar de Referencia Interna

El C.V. entre los datos del ensayo de los dos analistas entra en la especificación, que es de 0.19, por lo que el promedio de las 10 determinaciones se considera como el valor real de la ASH, que es de 9.932% (99.32mg/ml), por lo que es seleccionada como Estándar de Referencia y se utilizará en todos los cálculos que se requieran en ésta Validación para la preparación de las muestras a utilizar.

4.1.2 Estandarización del suero de ASB como Estándar de Referencia Interna

El C.V. entre los datos del ensayo de los dos analistas entra en la especificación, que es de 0.27, por lo que el promedio de las 10 determinaciones se considera como el valor real de la ASB, que es de 96.04% (960.4mg/ml), por lo que es seleccionada como Estándar de Referencia Interna y se utilizará en la evaluación de la Estabilidad de la muestra analítica.

4.1.3 Estandarización del gel de hidróxido de aluminio para la preparación de muestras

El C.V. entre los datos del ensayo de los cuatro analistas entra en la especificación, que es de 0.86, por lo que el promedio de las 20 determinaciones se considera como el valor real del Gel de hidróxido de aluminio, que es de 2.95% v/v; por lo que es seleccionada para estandarizarla y utilizarla con Estándar de Referencia Interna, para cuantificar su capacidad de adsorción en las que está presente el hidróxido de aluminio a diferentes concentraciones.

4.2 RESULTADOS DE LA MATERIA PRIMA

TABLA 13. Resultados obtenidos de la Materia Prima.

PRUEBA	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS
DESCRIPCIÓN	Suspensión blanca, viscosa. Al mantenerse en reposo pueden separarse en pequeñas cantidades de líquido	Conforme
ENSAYOS DE IDENTIDAD	A) Positiva B) Positiva	A) Positiva B) Positiva
pH	Entre 5.5 y 8.0	6.05
CLORUROS	Máximo 4.7%	Pasa prueba
SULFATOS	Máximo 0.8%	Pasa prueba
ARSÉNICO	Máximo 10ppm	8.8ppm
METALES PESADOS	Máximo 8.3ppm	Pasa prueba
CAPACIDAD NEUTRALIZADORA DE ÁCIDO	Mínimo 65%	68.8% v/v
LÍMITES MICROBIANOS	Ausencia de E. coli. La cuenta total de microorganismos aerobios no es mayor de 100UFC/ml	Ausencia de E. coli. La cuenta total de microorganismos aerobios no es mayor de 100UFC/ml
VALORACIÓN	De 2.91 a 3.21% p/p	2.95% p/p
CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS	De 16 a 26mg de ASH/ml	17.75mg de ASH/ml

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESPECIFICACIONES DE LA MATERIA PRIMA

CONCLUSIÓN:

Se concluye que las pruebas para la materia prima cumplen con todas las especificaciones, por lo que el gel de hidróxido de aluminio es seleccionado para estandarizarla y utilizarla con Estándar de Referencia Interna, para cuantificar su capacidad de adsorción en las que está presente el hidróxido de aluminio a diferentes concentraciones.

4.3 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.3.1 Linearidad del Sistema

TABLA 14. Linearidad del Sistema de ASH.

NIVEL (%)	VALOR TEÓRICO DE ASH (mg/ml)	VALOR EXPERIMENTAL DE ASH (mg/ml)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
40	1.6	1.596	1.601	0.0046	0.288
		1.604			
		1.604			
55	2.2	2.201	2.201	0.0	0.0
		2.201			
		2.201			
70	2.8	2.790	2.796	0.0052	0.186
		2.799			
		2.799			
85	3.4	3.404	3.404	0.0	0.0
		3.404			
		3.404			
100	4.0	3.993	3.996	0.0052	0.130
		3.993			
		4.002			
115	4.6	4.599	4.596	0.0052	0.113
		4.599			
		4.590			
130	5.2	5.205	5.205	0.0	0.0
		5.205			
		5.205			

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

TABLA 15. Linearidad de Sistema de ASH. Concentración teórica, concentración experimental, porcentaje de recobro y porcentaje de recobro ajustado al 100%.

NIVEL (%)	VALOR TEÓRICO DE ASH (mg/ml)	VALOR EXPERIMENTAL DE ASH (mg/ml)	PORCIENTO DE RECUBRO	PORCIENTO DE RECUBRO AJUSTADO AL 100%
40	1.6	1.596	39.89	99.73
		1.604	40.10	100.26
		1.604	40.10	100.26
55	2.2	2.201	55.04	100.06
		2.201	55.04	100.06
		2.201	55.04	100.06
70	2.8	2.790	69.75	99.65
		2.799	69.97	99.95
		2.799	69.97	99.95
85	3.4	3.404	85.11	100.13
		3.404	85.11	100.13
		3.404	85.11	100.13
100	4.0	3.993	99.83	99.83
		3.993	99.83	99.83
		4.002	100.04	100.04
115	4.6	4.599	114.97	99.98
		4.599	114.97	99.98
		4.590	114.76	99.79
130	5.2	5.205	130.12	100.09
		5.205	130.12	100.09
		5.205	130.12	100.09

b= Intercepto m= Pendiente r^2 = Coeficiente de determinación

r= Coeficiente de correlación

X= Promedio* DE= Desviación Estándar* CV= Coeficiente de Variación*

* Ver Tabla 14.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 16. Criterios de aceptación y Resultados de la Linearidad del Sistema.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS
Coefficiente de correlación: $r \geq 0.99$	$r = 0.99999$
Coefficiente de determinación: $r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.99998$
Ordenada: $b \neq 0$	$b = -2.98 \times 10^{-4}$
Pendiente: $m \approx 1$	$m = 1.000$
Porcentaje de Recobro: 97 - 103%	$X = 100.004\%$
Coefficiente de Variación: $C.V. \leq 1.5\%$	$C.V. = 0.16206$

RECTA DE REGRESIÓN

$$y = mx + b$$

$$x = \frac{y - b}{m} = \frac{y + 2.98 \times 10^{-4}}{1.000}$$

y: absorbancia

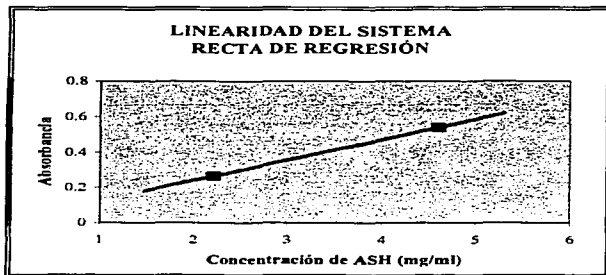
x: concentración

MARIANA CASTANEDA HERNÁNDEZ

Gráfica 1. Linearidad del Sistema de la validación del método analítico.



Gráfica 2. Recta de regresión calculada para la linealidad del sistema.



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TABLA 17. Comprobación de la Linearidad del Sistema mediante el ANADEVA (Análisis de varianza).

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp.}	F _{tables}
Regresión	1	30.244	30.244	1196399.9	8.18
Error de regresión	19	4.803X10 ⁻⁴	2.528X10 ⁻⁵		
Falta de ajuste	5	2.756X10 ⁻⁴	5.513X10 ⁻⁵	3.771	4.38
Error puro	14	2.047X10 ⁻⁴	1.462X10 ⁻⁵		

$$F_r > F_{(1,19;0.01)} \text{ y } F_{fa} < F_{(5,14;0.05)}$$

Comprobación del intervalo de confianza para la ordenada al origen:

- Desviación estándar de la regresión: $S_{y \cdot x} = 0.00503$
- Desviación estándar de la ordenada al origen: $S_b = S_{y \cdot x} = 0.656$

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

Intervalo de confianza para la Pendiente:

$$IC(m) = LI 0.998, LS 1.002$$

$$“t” \text{ de Student: } t_{19,0.975} = 2.0930$$

Intervalo de confianza para la Ordenada al origen:

$$IC(b) = LI -0.0072, LS 0.0066$$

$$“t” \text{ de Student: } t_{19,0.975} = 2.0930$$

Coefficiente de variación de Regresión:

$$CV_{y/x} = 0.148$$

LINEARIDAD DEL SISTEMA**CONCLUSIÓN:**

El Sistema es lineal ya que el C.V. es de 0.162, y los límites son $\leq 1.5\%$.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

4.3.2 Precisión del Sistema

TABLA 18. Precisión del Sistema de ASH.

NIVEL (%)	VALOR TEÓRICO DE ASH (mg/ml)	VALOR EXPERIMENTAL DE ASH (mg/ml)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
100	4.0	4.002	4.002	0.0054	0.135
		3.993			
		4.002			
		4.002			
		4.010			
		4.002			

X= Promedio DE= Desviación Estándar CV= Coeficiente de Variación

TABLA 19. Concentración teórica, concentración experimental y porcentaje de recobro.

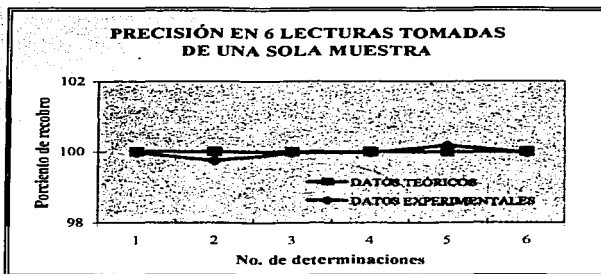
NIVEL (%)	VALOR TEÓRICO DE ASH (mg/ml)	VALOR EXPERIMENTAL DE ASH (mg/ml)	PORCIENTO DE RECOBRO
1	100	4.002	100.04
2		3.993	99.83
3		4.002	100.04
4		4.002	100.04
5		4.010	100.26
6		4.002	100.04

CRITERIO DE ACEPTACION

C.V. \leq 1.5%

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCION DE PROTEINAS DEL GEL DE HIDROXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3. Precisión del Sistema de la validación del método analítico.

PRECISIÓN DEL SISTEMA

CONCLUSIÓN:

El sistema es preciso ya que el C.V. es de 0.135, y los límites son $\leq 1.5\%$.

4.3.3 Determinación Preliminar

TABLA 20. Determinación Preliminar de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.

CONCENTRACIÓN DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO (%)				
0.25	0.5	1.0	2.0	2.95
CANTIDAD ADSORBIDA POR EL HIDRÓXIDO DE ALUMINIO (mg ASH/ml)				
X = 1.48	X = 3.05	X = 6.02	X = 11.71	X = 17.75
DE = 0.016	DE = 0.024	DE = 0.062	DE = 0.041	DE = 0.052
CV = 1.101	CV = 0.803	CV = 1.03	CV = 0.349	CV = 0.291

X= Promedio DE= Desviación Estándar CV= Coeficiente de Variación

CRITERIO DE ACEPTACION

C.V. \leq 3%

DETERMINACIÓN PRELIMINAR**CONCLUSIÓN:**

Las determinaciones de cada concentración cumplen con el criterio de aceptación, ya que el C.V. es de 0.16, y los límites son \leq 3%; por lo tanto los promedios de cada una se utilizan como referencia para calcular los recobros de las pruebas de la Validación del método analítico.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

4.3.4 Linearidad del Método

TABLA 21. Linearidad del Método de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA DE GEL DE $Al(OH)_3$ (%)	VALOR TEÓRICO DE ASH (mg/ml)	VALOR EXPERIMENTAL DE ASH (mg/ml)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN
0.25	1.48	1.49	1.49	0.0	0.0
		1.49			
		1.49			
0.5	3.05	3.04	3.06	0.035	1.132
		3.04			
		3.10			
1.0	6.02	5.98	5.98	0.0	0.0
		5.98			
		5.98			
2.0	11.71	11.69	11.76	0.058	0.491
		11.79			
		11.79			
2.95	17.75	17.78	17.78	0.0	0.0
		17.78			
		17.78			

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TABLA 22. Linearidad del Método de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio. Concentración teórica de ASH adsorbida, concentración experimental de ASH adsorbida, porcentaje de recobro y porcentaje de recobro ajustado al 100%.

CONCENTRACIÓN TEÓRICA DE GEL DE ALOH ₃ (%)	VALOR TEÓRICO DE ASH (mg/ml)	VALOR EXPERIMENTAL DE ASH (mg/ml)	PORCIENTO DE RECUBRO	PORCIENTO DE RECUBRO AJUSTADO AL 100%
0.25	1.48	1.49	0.252	100.96
		1.49	0.252	100.96
		1.49	0.252	100.96
0.5	3.05	3.04	0.498	99.69
		3.04	0.498	99.69
		3.10	0.508	101.65
1.0	6.02	5.98	0.992	99.23
		5.98	0.992	99.23
		5.98	0.992	99.23
2.0	11.71	11.69	1.993	99.66
		11.79	2.010	100.51
		11.79	2.010	100.51
2.95	17.75	17.78	2.949	99.97
		17.78	2.949	99.97
		17.78	2.949	99.97

b= Intercepto m= Pendiente r²= Coeficiente de determinación

r= Coeficiente de correlación

X= Promedio* DE= Desviación Estándar* CV= Coeficiente de Variación*

• Ver Tabla 21.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TABLA 23. Criterios de aceptación y Resultados de la Linearidad del Método.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN	RESULTADOS
Coefficiente de correlación: $r \geq 0.99$	$r = 0.99998$
Coefficiente de determinación: $r^2 \geq 0.98$	$r^2 = 0.99997$
Ordenada: $b \neq 0$	$b = -0.00781$
Pendiente: $m \approx 1$	$m = 1.0024$
Porcentaje de Recobro: $97 - 103\%$	$X = 100.146\%$
Coefficiente de Variación: $C.V. \leq 3\%$	$C.V. = 0.7442$

RECTA DE REGRESIÓN

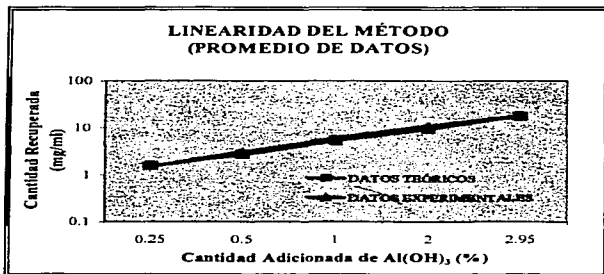
$$y = mx + b$$

$$x = \frac{y - b}{m} = \frac{y + 0.00781}{1.0024}$$

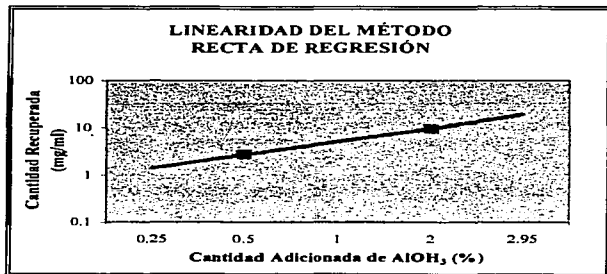
y: absorbancia

x: concentración

Gráfica 4. Linealidad del método de la validación del método analítico.



Gráfica 5. Recta de regresión calculada para la linealidad del método.



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TABLA 24. Comprobación de la Linearidad del Método mediante el ANADEVA (Análisis de varianza).

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{exp}	F _{tablas}
Regresión	1	541.863	541.863	405778.96	9.07
Error de regresión	13	1.736X10 ⁻²	1.335X10 ⁻³		
Falta de ajuste	3	8.293X10 ⁻³	2.764X10 ⁻³	3.049	4.67
Error puro	10	9.067X10 ⁻³	9.067X10 ⁻⁴		

$$F_r > F_{(1,13;0.01)} \text{ y } F_{fa} < F_{(3,10;0.05)}$$

Comprobación del intervalo de confianza para la ordenada al origen:

- Desviación estándar de la regresión: $S_{y.x} = 0.0365$
- Desviación estándar de la ordenada al origen: $S_b = S_{y.x} = 0.431$

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

Intervalo de confianza para la Pendiente:

$$IC(m) = LI 0.998, LS 1.006$$

$$“t” \text{ de Student: } t_{13,0.975} = 2.1604$$

Intervalo de confianza para la Ordenada al origen:

$$IC(b) = LI -0.043, LS 0.027$$

$$“t” \text{ de Student: } t_{13,0.975} = 2.1604$$

Coefficiente de variación de Regresión:

$$CV_{y/x} = 0.473$$

LINEARIDAD DEL MÉTODO**CONCLUSIÓN:**

El método es lineal ya que el C.V. es de 0.744, y los límites son $\leq 3\%$.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3.5 Exactitud del Método

TABLA 25. Exactitud del Método de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.

No. DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (%)		
	0.25	1.0	2.95
	PORCIENTO DE RECUBRO AJUSTADO AL 100%		
1	100.68	99.34	100.17
2	100.68	101.33	99.61
3	100.68	99.34	100.2
4	97.97	99.34	100.17
5	100.68	101.33	100.73
6	100.68	99.34	100.17
X	100.23	100.00	100.17
DE	1.106	1.028	0.35
CV	1.104	1.028	0.354

X= Promedio DE = Desviación Estándar CV = Coeficiente de Variación

CRITERIO DE ACEPTACION

CV \leq 3.0%

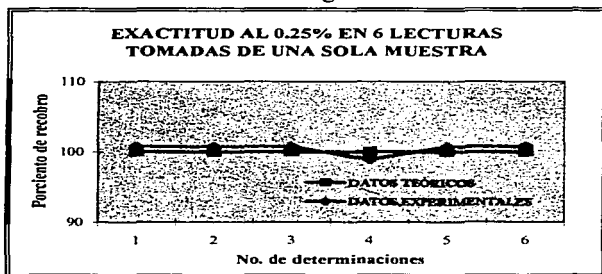
Porcentaje de Recobro 97-103%

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR LA CAPACIDAD DE ADSORCION DE PROTEINAS DEL GEL DE HIDROXIDO DE ALUMINIO DESTINADO PARA LA PRODUCCION DE VACUNAS HUMANAS

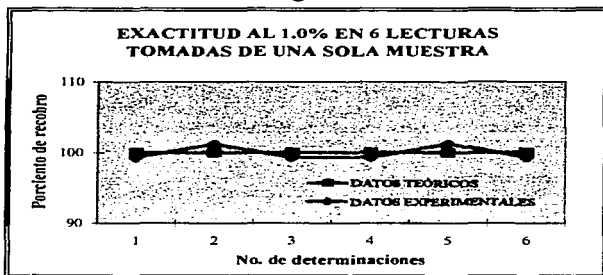
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARIANA CASTANEDA HERNANDEZ

Gráfica 6. Exactitud del método al 0.25% de gel de Hidróxido de aluminio.



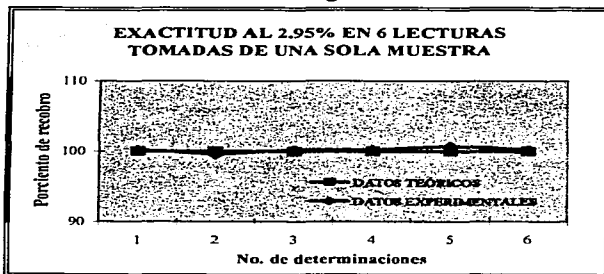
Gráfica 7. Exactitud del método al 1% de gel de Hidróxido de aluminio.



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

MARIANA CASTAÑEDA HERNÁNDEZ

Gráfica 8. Exactitud del método al 2.95% de gel de Hidróxido de aluminio.

**Intervalo de confianza para la media poblacional:**

IC = LI 99.713, LS 100.555

"t" de Student: $t_{17,0.975} = 2.1098$ **EXACTITUD DEL MÉTODO****CONCLUSIÓN:**

El método es exacto en el intervalo de 0.25, 1.0 y 2.95%; ya que el C.V. es de 0.846, y los límites son $\leq 3\%$.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4.3.6 PRECISIÓN DEL MÉTODO: Reproducibilidad

TABLA 26. Reproducibilidad del Método para la capacidad de adsorción de proteínas del gel de Hidróxido de aluminio.

DÍA	ANALISTA 1	ANALISTA 2
	PORCIENTO DE RECOBRO	
1	100.3	97.3
	100.3	101.4
	99.7	97.9
2	100.3	102.7
	99.7	99.7
	100.3	100.2

TABLA 27. Parámetros y Resultados de los 12 datos (2 analistas/2 días).

PARÁMETRO	RESULTADO DE LOS 12 DATOS (2 Analistas/2 Días)
X	17.725
DE	1.40
CV	1.40

X = Promedio DE = Desviación Estándar CV = Coeficiente de Variación

CRITERIO DE ACEPTACION

CV \leq 3%

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MARIANA CASTANEDA HERNÁNDEZ

PRECISIÓN DEL MÉTODO

CONCLUSIÓN:

El método es preciso (reproducibile) entre analistas, y por un analista en días diferentes.

El método se considera robusto en las condiciones de días y analistas en las cuales se lleva a cabo la prueba.

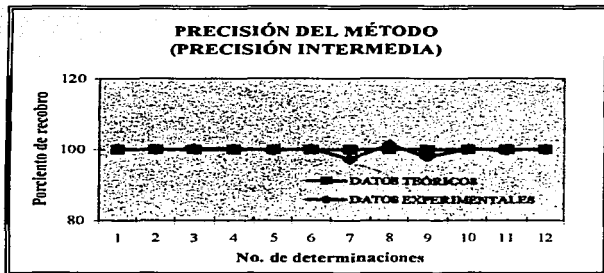
TABLA 28. Comprobación de la Repetibilidad (precisión intermedia) mediante el ANADEVA (Análisis de varianza).

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	F _{calc}	F _{tablas}
ANALISTA	1	0.16	0.16	0.05	18.51
DÍA	2	6.00	3.00	1.55	4.46
ERROR	8	15.45	1.93		

CRITERIO DE ACEPTACION:

ANALISTA: Si $F_{calculada}$ es menor que F_{tablas} el método analítico es reproducible por los analistas.

DÍA: Si $F_{calculada}$ es menor que F_{tablas} , el método analítico es reproducible en distintos días por un mismo analista

Gráfica 9. Precisión del método de la validación del método analítico.

PRECISIÓN DEL MÉTODO

CONCLUSIÓN:

El método analítico es reproducible entre diferentes analistas y en distintos días por un mismo analista.

4.3.7 Estabilidad de la Muestra Analítica

TABLA 29. Estabilidad de la muestra analítica.

MUESTRA	ANÁLISIS INICIAL (%R)	CONDICIÓN "A" (%R)	CONDICIÓN "B" (%R)	CONDICIÓN "C" (%R)
1	100	102.20	94.65	102.14
2	100	102.20	95.21	102.14
3	100	99.83	94.65	99.77
INTERVALO DE CONFIANZA		-0.59 - 3.41	-5.63 - -4.68	-0.65 - 3.35
FACTOR I (promedio)		101.41	94.84	101.35

%R = Porcentaje de recobro

t_D = Tabla de distribución "t" de Dunnettt_D(6,3;0.05) = 3.10

CRITERIO DE ACEPTACION

- Coeficiente de Variación C.V. \leq 3%

Estabilidad de la Muestra Analítica:

- Intervalo de confianza (IC) para la diferencia de la media de la muestra almacenada con respecto a la media del análisis inicial incluye el valor de cero.
- El porcentaje de recuperación esta entre 97-103%

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA**CONCLUSIÓN:**

La prueba de la Estabilidad de la muestra analítica cumple con el criterio de aceptación para las condiciones A y C, por lo que esta prueba se podrá realizar con la técnica descrita por el proveedor, así como también es posible utilizar ASB en lugar de ASH cuando así se requiera sin que esto altere el resultado de la prueba (condición A) y/o realizar la técnica descrita pero a temperatura ambiente (condición C); no así para la condición B ya que en este caso el IC no pasa por el valor cero.

INFORME DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas	Fecha de Validación:	Página: 1 de 3
--	----------------------	----------------

5. INFORME DE VALIDACIÓN DE MÉTODO ANALÍTICO

5.1 PROPÓSITO

Documentar que con la Validación del método analítico para la Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas, si es adecuada para su propósito y cumple de manera consistente con los criterios de aceptación predeterminados para linealidad y precisión del sistema, linealidad y precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad) exactitud y estabilidad de la muestra analítica.

5.2 RESULTADOS

TABLA 30. Resultados del método analítico.

DETERMINACIÓN	ESPECIFICACIÓN	RESULTADOS
LINEARIDAD DEL SISTEMA	Coeficiente de correlación $r \geq 0.99$ Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$ Coeficiente de variación $CV \leq 1.5$	$r = 0.99999$ $r^2 = 0.99998$ C.V. = 0.162

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
 LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
 DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

INFORME DE VALIDACIÓN Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas	Fecha de Validación:	Página: 2 de 3
--	----------------------	----------------

TABLA 30. Continuación.

LINEARIDAD DEL MÉTODO	Pendiente (m) ≈ 1 Ordenada (b) ≈ 0 Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$ Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$	Pendiente (m) = 1.0024 Ordenada (b) = -0.00781 $r^2 = 0.99998$ C.V. = 0.744
PRECISIÓN DEL SISTEMA	Coeficiente de variación $CV \leq 1.5$	C.V. = 0.135
PRECISIÓN DEL MÉTODO ♦ Repetibilidad ♦ Reproducibilidad	♦ Coeficiente de correlación $r \geq 0.99$ Coeficiente de determinación $r^2 \geq 0.98$ Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$ ♦ Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$	♦ $r = 0.99997$ $r^2 = 0.99998$ CV = 0.744 ♦ CV = 1.40
EXACTITUD DEL MÉTODO	Coeficiente de variación $CV \leq 3.0$	C.V. = 0.846
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA DEL MÉTODO	Porcentaje de recobro 97 – 103 %	Condición A: 101.41 % Condición C: 101.35 %

INFORME DE VALIDACIÓN

Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del Gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas

Fecha de Validación:

Página: 3 de 3

5.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El método propuesto para la determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio cumple su propósito, por lo que se le considera efectivo y confiable por ser lineal, exacto, preciso (repetibilidad y reproducibilidad) y estable; por lo que esta prueba podrá realizarse con la técnica descrita por el proveedor, así como también es posible realizar la técnica descrita pero a temperatura ambiente y/o utilizarse estándar de ASB en lugar de ASH.

5.4 CONCLUSIONES

La Validación de la Determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio destinado para la producción de vacunas humanas se encuentra

VALIDADO

Fin del Informe de Validación de Método Analítico

PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

-120-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método para la determinación de la capacidad de adsorción de proteínas del gel de hidróxido de aluminio se validó conforme a la técnica propuesta por el proveedor.

Basándose en los resultados obtenidos se demostró de manera práctica y documentada que el método propuesto cumple su propósito, por lo que se le considera efectivo y confiable por ser lineal, exacto, preciso, específico y estable.

Se evaluó el sistema de medición resultando ser PRECISO y LINEAL en el intervalo de 35-130% del contenido de ASH (1.6-5.2mg/ml) considerando 4.0mg/ml como el 100%.

Se concluye que el método es LINEAL y EXACTO en el intervalo de 0.25-2.95% de la concentración de hidróxido de aluminio $[Al(OH)_3]$ equivalente a 1.47-17.75mg/ml adsorbidos, además el método es PRECISO (reproducible) y ESPECÍFICO.

Para el caso de la precisión intermedia cumple con el criterio de aceptación del ANADEVA y se concluye que el método analítico es reproducible entre analistas y en distintos días para cada uno de los analistas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la estabilidad del método analítico del método se determinó que las muestras no son estables si el tiempo de reposo se prolonga hasta las 72 horas en refrigeración y sin agitación esporádica, ya que los resultados no se reproducen.

Por otro lado el análisis de las muestras puede llevarse a cabo con la técnica descrita por el proveedor, así como también es posible realizar la técnica descrita pero a temperatura ambiente ya que los resultados se reproducen. Durante la validación se probó utilizar ASB (albúmina sérica bovina) en lugar de ASH (albúmina sérica humana) obteniendo resultados satisfactorios y reproducibles por lo que se puede utilizar cualquiera de las dos albúminas.

REFERENCIAS DOCUMENTALES

1. ABBAS, Abul. Immunología Celular y Molecular, 3ª Edición, Editorial Mc Graww-Hill Interamericana, España, 1999, p.p.4-6.
2. AI-SHAKSHIR R. y REGNIER F. Contribution of electrostatic and hydrobic interactions to the adorption of proteins by aluminium containing adjuvants. Vaccine. 1995, p.p.41.
3. CÁRDENAS, R.H.L. y CORTES, A.A.R. Aspectos Biofarmacéuticos de la Evaluación de Medicamentos, 2ª Edición, Editorial U.A.M., México D.F. 2000, p.p.247-259.
4. COCKAYNE, Anderson. Química Clínica, Nueva Editorial Interamericana, Mc Graw-Hill, México, 1995, p.p.199.
5. Dickson, T. Introducción a la Química, Publicaciones cultural, S.A. de C.V. México, D.F. 1982, p.p.296.
6. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, FEUM 7ª Edición, México, 2000 Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos CPFEUM, Métodos Generales de Análisis.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. Guía de Validación de Métodos Analíticos, Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Con Registro ante la DGP, F-032, Edición 2002.
8. HARRIS, Daniel C. Análisis Químico Cuantitativo, Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F., 1992, p.p.498-499.
9. HEPPLÉ, J.R. et coll. Applications of Aluminium Hydroxide, Adjuvant/amino acid complexes. 1990, Vol. 71, No.11, p.p.201.
10. LINDBLAD Be. Adjuvants: A balance between toxicity and adjuvancity and vaccines. The Biol Stand, 1993, p.p.293.
11. LITTER, Manuel. Compendio de Farmacología, 4ª Edición, Editorial El Ateneo, Buenos Aires, 1992, p.p.336, 877, 886.
12. LYNCH Matthew. Métodos de Laboratorio, 2ª Edición, Nueva Editorial Interamericana, México D.F., 1972, p.p.224.
13. PROGAR J.J. The aluminium content of biological products containing aluminium adjuvants, USA, 1984, p.p.175.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
F. A DE ORIGEN

14. REMINGTON. Farmacía, Tomo 2, 19ª Edición, Editorial Médica Panamericana, Marcelo Buenos Aires, 1998, p.p.2179, 2190-2193.
15. STEWART, Tull. Recommendations for the assessment of adjuvants: Immunological adjuvants and vaccines, New York, Plenum, 1989, p.p.213.
16. The United States Pharmacopeia. USP 25, The National Formulary NF19. 2000, General Chapters, Printed by National Publishing, Philadelphia, PA. p.p.1255.
17. United States Pharmacopeia. USP 23, to Issue by Authority of the United States Pharmacopeia Convention Inc., Meeting at Washington, D.C. March 8-10, 1990. Prepared by the Comité of Revision and Published by the Board of Trustees.

OTRO TIPO DE INFORMACIÓN:

18. Información proporcionada por el fabricante.
19. <http://www.vacunas.net/capitulo2.htm>
20. <http://www.gencat.es/sanitat/es/entrada.htm>

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR
LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE PROTEÍNAS DEL GEL DE HIDRÓXIDO DE ALUMINIO
DESTINADO PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS HUMANAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN