



**Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**TESIS:**

**“CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN FUROSEMIDA  
20mg INYECTABLE MEDIANTE LA PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITO  
DE *Limulus*”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**Químico Farmacéutico**

**BACHILLER:** HUAMAN BENITES, Angie Estibel

**ASESOR:** Q.F. MONTEAGUDO MONTENEGRO, Fabricio

**LIMA – PERÚ**

**2016**

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermana por su ejemplo de lucha, aliento, comprensión y eterno amor, por ser autores de lo que hoy soy.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por el gran amor y apoyo brindado; pero en especial a mi padre que me ha enseñado a seguir adelante a pesar de las dificultades.

## RESUMEN

Los pirógenos son sustancias bacterianas que pueden resistir los métodos convencionales de esterilización presentándose en grandes cantidades después de la muerte y lisis de celular, su administración en productos parenterales contaminados provoca fiebre al hombre y/o animales, siendo los más importantes las endotoxinas de las bacterias Gram negativas.

La prueba LAL (Limulus amebocyte lysate) se emplea para cuantificar las endotoxinas mediante una reacción de coagulación y formación de un gel.

El presente trabajo tuvo por objetivo la determinación de endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg/2ml inyectable mediante la prueba de lisado de amebocito de *Limulus* por el método de coagulación. La muestra fue puntual ya que fue tomada en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, fueron 40 furosemidas inyectables las cuales fueron evaluadas siguiendo los parámetros de la metodología oficial de la prueba de endotoxinas bacterianas dada por la Pharmacopea de los Estados Unidos (USP38), los ensayos se realizaron en las instalaciones NSF Inassa S.A.C., comprobándose que las muestras analizadas presentan un resultado menor de 0.24 unidades USP de endotoxinas en la dilución de prueba.

Por lo cual se concluyó que la cantidad de endotoxinas en furosemida 20mg/2ml inyectable no sobrepasa los parámetros establecidos 3,6 UE/mg según USP38.

## **ABSTRACT**

Pyrogens are bacterial substances that can withstand conventional sterilization methods appearing in large numbers after death and lysis of cell, its administration in contaminated parenteral products causes fever in humans and / or animals, the most important endotoxins of bacteria Gram negative.

The LAL test (Limulus amoebocyte lysate) is used to quantify endotoxins by a coagulation reaction and gel formation.

This study aimed to determine bacterial endotoxins in furosemide 20 mg / 2 ml injection by test limulus amoebocyte lysate by the method of coagulation. The sample was timely as it was taken in the National Guillermo Almenara Irigoyen Hospital were 40 injectable furosemidas which were evaluated according to the parameters of the official methodology for testing bacterial endotoxins given by the Pharmacopeia of the United States (USP38), the assays were performed in facilities Inassa SAC NSF, proving that the samples analyzed result of lower 0.24 USP units of endotoxins in the test dilution.

Therefore it was concluded that the amount of endotoxin in furosemide 20mg / 2ml injection does not exceed the parameters set 3.6 EU / mg USP38 according.

## ÍNDICE

<b>CARÁTULA.....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTO.....</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE GRAFICOS.....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>XII</b>
<b>CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>13</b>
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	13
1.2 Formulación del Problema.....	14
1.2.1. Problema General.....	14
1.2.2. Problemas Específicos.....	14
1.3 Objetivos de la Investigación.....	14
1.3.1 Objetivo General.....	14
1.3.2 Objetivos Específicos.....	15
1.4 Hipótesis de la Investigación.....	15
1.4.1 Hipótesis General.....	15
1.4.2 Hipótesis Secundarias.....	15

1.5 Justificación e Importancia de la Investigación.....	16
1.5.1 Justificación de la Investigación.....	16
1.5.2 Importancia de la Investigación.....	17
<b>CAPITULO II: MARCO TEORICO.....</b>	<b>18</b>
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	18
2.1.1 Antecedentes Nacionales.....	18
2.1.2 Antecedentes Internacionales.....	19
2.2 Bases teóricas.....	23
2.2.1 Inyectable.....	23
2.2.2 Vías de administración parenterales.....	24
2.2.3 Furosemida, inyección.....	25
2.2.3.1 Monografía oficial USP 38.....	25
2.2.4 Información farmacológica.....	29
2.2.4.1 Forma farmacéutica.....	29
2.2.4.2 Datos clínicos.....	29
2.2.4.3 Posología y forma de administración.....	29
2.2.4.4 Propiedades farmacológicas.....	30
2.2.4.5 Propiedades farmacocinéticas.....	31
2.2.4.6 Contraindicaciones.....	31

2.2.4.7 Advertencias.....	32
2.2.4.8 Embarazo y lactancia.....	36
2.2.4.9 Reacciones adversas.....	37
2.2.5 Las bacterias gran negativas.....	38
2.2.6 Los componentes de la pared celular de BGN.....	40
2.2.7 Historia de las endotoxinas.....	41
2.2.8 Pirógenos.....	42
2.2.9 Regiones de las endotoxinas bacterianas.....	44
2.2.10 Mecanismos de la fiebre.....	46
2.2.11 Toxinas bacterianas.....	47
2.2.12 Prueba de endotoxinas bacterianas.....	48
2.2.13 Historia del reactivo LAL .....	49
2.2.13.1 Principios biológicos.....	51
2.2.13.2 Bioquímica LAL – Endotoxinas.....	52
2.2.13.3 Métodos de la LAL .....	54
2.2.13.4 Interferencias en el ensayo LAL.....	57
2.3 Definición de términos básicos.....	58
<b>CAPITULO III: METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>61</b>
3.1 Tipo de Investigación.....	61
3.1.1 Nivel de Investigación.....	61
3.1.2 Método de la Investigación.....	61
3.1.3 Diseño de la Investigación.....	61



3.2 Población y muestreo de la investigación.....	62
3.2.1 Población.....	62
3.2.1.1 Delimitación cualitativa de la población.....	62
3.2.1.2 Delimitación cuantitativa de la población.....	62
3.2.2 Muestra.....	62
3.2.2.1 Criterios de inclusión.....	62
3.2.2.2 Criterios de exclusión.....	62
3.3 Variables e Indicadores.....	63
3.4 Procedimiento, técnicas e instrumentos de recolección de datos...63	
3.4.1 Procedimientos.....	63
3.4.2 Técnicas.....	66
3.4.3 Instrumento.....	67
<b>CAPITULO IV: PRESENTACIÒN, ANÀLISIS E INTERPRETACIÒN DE</b>	
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>DISCUSIÒN.....</b>	<b>72</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>MATRIZ DE CONSISTENCIA.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 <b>TÍTULO</b> Sensibilidad del reactivo LAL.....	63
Tabla N° 2 <b>TÍTULO</b> Confirmación de la sensibilidad reactivo LA.....	64
Tabla N° 3 <b>TÍTULO</b> Prueba de endotoxinas bacterianas.....	68
Tabla N° 4 <b>TÍTULO</b> Calculo de la máxima dilución valida.....	69
Tabla N° 5 <b>TÍTULO</b> Prueba límite de coagulación.....	70
Tabla N° 6 <b>TÍTULO</b> Dilución de trabajo.....	71

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura N° 1 <b>TÍTULO</b> Formula estructural de furosemida.....	25
Figura N° 2 <b>TÍTULO</b> Dibujo de las diferencias entre las envolturas celulares de las BGP Y BGN.....	40
Figura N° 3 <b>TÍTULO</b> Estructura química de la Pared celular de las BGN, se aprecia el complejo lipopolisacarido LPS y sus partes.....	44
Figura N° 4 <b>TÍTULO</b> Imagen del cangrejo de la herradura.....	51
Figura N°5 <b>TÍTULO</b> Representación de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de endotoxinas.....	53
Figura N°6 <b>TÍTULO</b> Representación de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de endotoxinas.....	54
Figura N° 7 <b>TÍTULO</b> Diluciones seriadas.....	64
Figura N° 8 <b>TÍTULO</b> Procedimiento general de preparación de tubos...	65
Figura N° 9 <b>TÍTULO</b> Esquema de interpretación de resultados.....	66

## INTRODUCCIÓN

La misión de la industria farmacéutica es la salud pública y su objetivo es la calidad de los medicamentos, por ello, se emplean métodos y técnicas que aseguran la obtención de fármacos de calidad que restablezcan la salud de los pacientes. (1) El control microbiológico en los productos parenterales es importante ya que se requiere que el fármaco sea inocuo asegurando que no se ponga en riesgo al paciente por causa del medicamento. (2) Las endotoxinas son unas de las moléculas más comunes a las cuales los humanos están expuestos ya que estas se liberan de las bacterias estimulando varias respuestas de inmunidad innata, una de las más comunes es la fiebre. Las endotoxinas bacterianas son principalmente lipopolisacáridos (LPS) que se localizan exclusivamente en la membrana externa de las bacterias gram negativas tales como *E.coli*, *Salmonella*, *Shigela*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Haemophilus*, y otros patógenos principales. Para la detección y cuantificación de endotoxinas se realiza la prueba de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) por el método de gelificación. Esta prueba es de origen bacteriano la cual resulta ser sensible y específica para la identificación de endotoxinas bacterianas llegando a detectar pequeñas partículas de endotoxinas, la cual se fundamenta en la coagulación de la hemolinfa por medio de la interacción de la endotoxina con los amebocitos contenidos en esta, lo que causa la liberación de una cascada de reacciones que hacen que se forme un gel visible y consistente. En el presente estudio se investigara un lote 75HK1967 de furosemida 20mg inyectable siendo este uno de los diuréticos más utilizados de uso cotidiano y hospitalario en seres humanos. La Farmacopea de los Estados Unidos UnitedStates of Pharmacopeia (USP) 38 establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método LAL como monitor de pirógenos para más del 90% de los parenterales que regula, exigiendo que el contenido de endotoxinas sea inferior a los límites establecidos (FDA), lo que es requisito indispensable para la comercialización de cualquier producto

## CAPÍTULO I:

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1 Descripción de la Realidad Problemática:

En la industria farmacéutica los productos parenterales se diferencian de los demás por su alto grado de pureza y por estar libres de contaminantes físicos, químicos y microbiológicos, ya que la presencia de cualquiera de estos puede afectar no solo la vida útil del fármaco sino también la salud del paciente.(3)

Como se sabe durante la elaboración de productos inyectables hay que tomar todas las medidas concebibles para evitar la contaminación pirogénica, así como disponer de un ensayo confiable de control en el producto terminado. (17)

El análisis de pirógenos constituye uno de los principales ensayos en el control de calidad de la fabricación de inyectables por su repercusión en la salud humana, puesto que la presencia y administración de los mismos, es capaz de provocar una serie de respuestas fisiológicas, en su mayoría de carácter perjudicial y en casos extremos, la muerte del paciente. Por las razones anteriores, existe un creciente interés en el conocimiento y dominio de estos métodos.

En la actualidad, para la aprobación y comercialización de gran parte de los productos farmacéuticos y biotecnológicos diseñados para ser administrados por vía parenteral, las principales instituciones reguladoras internacionales exigen dentro de sus monografías para productos inyectables la aplicación del método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la determinación de endotoxinas bacterianas (4), sustancias que administradas por vía parenteral y en dependencia de la dosis son capaces de provocar una respuesta febril, shock y muerte.

## **1.2 Formulación del Problema:**

### 1.2.1 Problema General

¿Cuál es la cantidad de endotoxinas bacterianas presentes en furosemida 20mg inyectable?

### 1.2.2 Problemas Específicos

¿Existe presencia de coagulación en furosemida 20mg inyectable?

¿La cantidad de endotoxinas bacterianas en furosemida de 20mg cumplen parámetros USP 38?

¿Cuál es la máxima dilución válida (MDV) para furosemida 20mg inyectable.

## **1.3 Objetivos de la Investigación**

### 1.3.1 Objetivo General

Determinar la cantidad de endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg inyectable mediante la prueba de lisado de amebocito de *Limulus*

### 1.3.2 Objetivos Específicos

Determinar la presencia de coagulación en furosemida 20mg inyectable.

Determinar si cumple con los parámetros USP 38 para la determinación de endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg inyectable.

Determinar la máxima dilución válida (MDV) que se le puede realizar a las furosemidas 20mg inyectable.

## 1.4. Hipótesis de la Investigación

### 1.4.1 Hipótesis General

La cantidad de endotoxinas bacterianas de furosemida 20mg inyectable se encuentra entre los rangos /3.3 - 3.7/ mediante la prueba lisado de amebocito de *Limulus*.

### 1.4.2 Hipótesis Secundarias

Existe presencia de coagulación.

La cantidad de endotoxinas bacterianas en los inyectables de furosemida 20mg sobrepasa el valor establecido USP 38.

La máxima dilución válida (MDV) para furosemida 20mg inyectable se encuentra entre los rangos /1.212 – 1.336/

## 1.5 Justificación e Importancia de la Investigación

### 1.5.1 Justificación de la Investigación.

Las endotoxinas debido a su alta resistencia a la destrucción térmica y química sobreviven a los métodos ordinarios de esterilización. Se caracterizan por su potente actividad biológica, por lo que son capaces de producir cambios fisiológicos cuando son administradas por vía parenteral. Una dosis de 1-10 ng/kg de endotoxinas, puede provocar una respuesta febril en el hombre. (10)

Los principales organismos internacionales, encargados de regular la elaboración de productos farmacéuticos exigen cada vez más en sus protocolos de calidad la aplicación del ensayo lisado de amebocito de *Limulus*LAL, en el control de la calidad en la fabricación de medicamentos administrados por vía intravenosa. De acuerdo a lo anterior, se utilizó el ensayo lisado de amebocito de *Limulus*LAL por método de gelificación que es de alta confiabilidad, fácil de usar además rápido comparado con otros métodos de detección, siendo un ensayo más económico.

La Farmacopea de los Estados Unidos (UnitedStates of Pharmacopeia (USP) 38 establece la cuantificación de endotoxinas bacterianas por el método LAL como monitor de pirógenos para más del 90% de los parenterales que regula, exigiendo que el contenido de endotoxinas sea inferior a los límites establecidos por la guía de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (Food and DrugAdministration (FDA), lo que es requisito indispensable para la comercialización de cualquier producto.



Esta investigación se realizó con el fin de valorar y detectar endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg inyectable de laboratorio Sanderson mediante la prueba de lisado de amebocito de *limulus* por el método de gelificación.

### **1.5.2 Importancia de la Investigación**

Hoy día, la calidad, inocuidad y seguridad de los productos farmacéuticos inyectables es de relevante importancia debido a su amplia formulación en la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades. En la industria de medicamentos parenterales grandes volúmenes de agua libre de pirógenos son requeridos para la preparación de medicamentos inyectables. El ambiente de los laboratorios, el personal, los implementos y equipos de trabajo, así como el agua y materias primas, albergan microorganismos que se desarrollan y afectan la calidad de los medicamentos parenterales. Un contaminante propio de origen bacteriano en estos medicamentos son las denominadas endotoxinas, provenientes de las bacterias gram negativas. Estas endotoxinas producen consecuencias en el organismo y en algunos casos pueden causar la muerte convirtiéndose en un peligro para el hombre.

Es por esto, que la industria farmacéutica requiere estandarizar técnicas rápidas y confiables, que permitan detectar la presencia de endotoxinas bacterianas, como lo es la prueba del Lisado de Amebocitos de Limulus (LAL) por el método de gelificación que detecta células inertes. Es usado para detección de endotoxinas (derivadas del lipopolisacárido LPS de las bacterias gram negativas). Se basa en la aglutinación de extractos de amebocito de sangre de *Limulus* (cangrejo de mar) (12) (13)

## CAPÍTULO II:

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la Investigación

##### 2.1.1 Nacional

Los investigación realizada por Koga Roberto, Otero Manuel, Caballero José, **“PRUEBAS BIOLÓGICAS DEL ANTICUERPO MONOCLONAL IOR-CEA1 MARCADO CON 131I, POR EL MÉTODO DE LA CLORAMINA T, PARA EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL ADENOCARCINOMA EMBRIONARIO”**, (2005) Perú .Establecieron que este marcador es útil en casos de cáncer colorectal, aumentado la concentración del antígeno con relación al estadio de la enfermedad. Se procedió a realizar las evaluaciones biológicas de este anticuerpo (distribución biológica (DB), toxicidad aguda, esterilidad y pirógenos).Para las de pirógenos LAL, se realiza una dilución de 1/200 del AcMo con agua despirogenada, homogenizando con la ayuda de un vortex por espacio de 30 segundos; con una jeringa se toma 0.2 ml se agrega al tubo LAL control negativo e igual cantidad al control positivo. Incubar por 1 hora a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1$  en baño maría. Pasado el tiempo de incubación, el tubo de control positivo debe formarse una fase sólida y el control negativo mantenerse en fase líquido. Finalmente se concluye que para las pruebas biológicas tenemos un producto estéril, no tóxico y libre de pirógenos. (16)

### 2.1.2 Internacionales

La investigación realizada por Carrillo C., Ospina J., Aldana D., ARIAS J., ECHEVERRI C., **“ESTANDARIZACIÓN Y VALORACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS POR LA TÉCNICA DE LISADO DEL AMEBOCITO DE LIMULUS (LAL) PARA DOS PRODUCTOS FARMACÉUTICOS: PENICILINA G SÓDICA Y RANITIDINA INYECTABLE POR EL MÉTODO DE GELIFICACIÓN”**. (2006) Colombia .Establecieron que para la investigación se tomarían tres muestras de tres lotes diferentes; las muestras fueron escogidas al azar y se tomó una muestra del principio, una de la mitad y otra del final de la producción para cada lote muestreado. Con las muestras de cada lote se realizó un pool, quedando así tres sublotes para analizar, dándole mayor confiabilidad al método. Se comprobó la sensibilidad del reactivo de LAL (0.25 UE/ml) y se calificó al operario con el fin de obtener resultados confiables. Se consultó en la USP XXVI el límite de endotoxina para penicilina G sódica, 0.01 UE/100 UI y ranitidina 7 UE/mg. Se calculó la máxima dilución válida (MDV) que fue de 1:400 y 1:700 respectivamente; se practicaron los ensayos preliminares (Unspike y Spike) con los cuales se determinó la Dilución de trabajo para penicilina 1:100 y ranitidina 1:200. Con el ensayo final se valoró la presencia de endotoxinas bacterianas en los dos productos inyectables. En el ensayo Unspike se demostró que el producto analizado de penicilina G sódica y ranitidina, no presentan endotoxinas, ni sustancias que pudieran dar falsos positivos, pues los resultados de todas las diluciones de las dos réplicas incluidos sus controles, fueron negativos. (9)

La investigación realizada por Burguet Lago Nancy, Reyes Tur María Isabel, Brito Godoy Lázaro C., Troche Concepción Yenilen,

**“VALORACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN EL INYECTABLE ÁCIDO ZOLEDRÓNICO MEDIANTE LA PRUEBA DE LISADO DEL AMEBOCITO DE *Limulus*”.**

(2012) Cuba. Establecieron la valoración de las endotoxinas en cuatro ampollas de tres lotes de ácido zoledrónico de 4mg, mediante el método de gelificación (gel-clot) los resultados fueron : la sensibilidad del lisado resultó 0,03125 UE/mL. La máxima dilución válida fue de 112 UE/mL y la dilución de trabajo 1/100. La cantidad de endotoxinas bacterianas presentes en tres lotes del producto inyectable no sobrepasó el límite establecido 0.875 UE/mg según lo establecido por USP 32, por lo que cumplió con las especificaciones de calidad establecidas para el ensayo.(8)

La investigación realizada por Osorio Colindres, Claudia Beatriz **“VALIDACION DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL) POR EL METODO GEL – CLOT UTILIZANDO EL PRODUCTO FUROSEMIDA (20 MG) INYECTABLE”**, (2011) Centro América. Hace referencia en la presente investigación que tuvo por objeto la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas por el método gel – clot utilizando el producto Furosemida (20 mg) solución inyectable. La muestra fue puntual ya que se trabajó con muestras producidas por un laboratorio nacional certificado, se utilizaron los lineamientos de la Guía de Validación de dicho método referidos por la FDA y la metodología oficial de la prueba de endotoxinas bacterianas dada por la Farmacopea de los Estados Unidos, edición 32; los ensayos fueron realizados en las instalaciones de dicho laboratorio nacional. Se realizó

también la prueba de factores de interferencia con tres lotes diferentes de producto ejecutando tres ensayos por lote: uno por cada analista. Comprobándose que las muestras analizadas no presentan ningún factor que pueda inducir o bien inhibir la formación de los coágulos si hubiese o no presencia de endotoxinas en la muestra. Posterior a esto se les realizó la prueba de límite de coagulación con la que se determinó que las muestras no presentan más de 0.125 unidades endotoxinas bacterianas por ml de Furosemida (14)

La investigación realizada por Rivera Zumaque, Pablo C. **“ESTUDIO VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ENDOTOXINAS EN MEDICAMENTOS DE DAPIRONA Y CLINDAMICINA”**. (2015), Colombia. Donde se estableció que las endotoxinas son una de las moléculas más comunes a las que los humanos están expuestos. El término de endotoxinas se utiliza de vez en cuando para referirse a cualquier toxina bacteriana relacionada con las células, se reserva correctamente para referirse al complejo de lipopolisacáridos asociados con la membrana externa de bacterias gram negativas tales como *E.Coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, etc. Para la detección de endotoxinas se realiza la prueba de lisado de amebocitos *Limulus* (LAL). Esta prueba es de origen bacteriano la cual resulta ser sensible y específica para la identificación de endotoxinas bacterianas llegando a detectar pequeñas partículas de endotoxina. En los resultados se obtuvieron que las ampollas de clindamicina su máxima dilución válida (MDV) ,1.690 y la máxima dilución válida (MDV) de la dipirona 1.170 donde el ensayo no se encontraron pirógenos.

La investigación realizada por Osorio, Olga, Pérez Mancilla, Ximena, Arias Palacios, Janeth, Rodríguez Vargas, Dora, Y Fernández López, Cindy, **“INTERFERENCIAS EN LA VALIDACIÓN DEL ENSAYO DE LISADO DE AMEBOCITOS DE LIMULUS PARA OXITETRACICLINA 50 mg/ml”** (2011) Cuba. Establecieron el método de LAL gel-clot para validar la detección de endotoxina bacteriana en la oxitetraciclina producida por un laboratorio maquilador de productos farmacéuticos veterinarios de Bogotá, Colombia. Para este objetivo se tomaron muestras al inicio, intermedio y final de 3 lotes diferentes del medicamento y se realizó la prueba de validación tal y como lo especifica la UnitedStatesPharmacopea XXV. Los resultados para la máxima dilución válida del producto (1:80) de la prueba Spike mostraron el 100 % de inhibición hasta la dilución 1:16 y 0 % de inhibición en las siguientes diluciones. En la prueba Unspike se muestra un realce de la prueba a partir de la dilución 1:32. El rótulo para un reactivo de LAL con sensibilidad (I) de 0,25 unidades de endotoxinas por mililitro (UE/mL) y el operario que realizó el ensayo quedaron validados. (15)

La investigación realizada por: Llanga Huaraca, Kristian Anibal **“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS LAL (LÍMULUS AMEBOCYTE LYSATE) POR EL MÉTODO GEL-CLOT EN LA SOLUCIÓN INYECTABLE DE HIALURONATO DE SODIO ALURONIC BLISPACK DE GISBERG ECUADOR S.A”** (2014)-Ecuador. Realizó la validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (Limulus Amebocyte lísate) por el método de gelificación GEL-CLOT, utilizando la solución inyectable de Hialuronato de sodio ALURONIC Blispack, proceso que se desarrolló en el laboratorio microbiológico del

departamento de control de calidad de la industria farmacéutica GINSBERG S.A de la ciudad de Quito, provincia de Pichincha, para ser aplicado en futuros análisis del producto. Se elaboró un protocolo de validación basado en la metodología oficial de pruebas de endotoxinas bacterianas dadas por la farmacopea de los Estados Unidos, edición 35, se realizó ensayos preliminares y de validación, con un muestreo al azar de tres lotes pilotos de ALURONIC Blispack, la comprobación del pH óptimo de la muestra, un ensayo de verificación del reactivo LAL que fue desarrollo paralelamente con la validación del analista, el cálculo del máximo valor de dilución, pruebas de factores de inhibición, interferencia o realce y la prueba límite de coagulación determinando que la muestra no presenta más de 0.25 unidades de endotoxinas bacterianas por ml de Hyaluronato de sodio. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el producto está libre de endotoxinas bacterianas y que es apto para su administración en pacientes que lo requieran y que la metodología en mención queda validada. Se recomienda la aplicación de este proceso en futuros análisis del producto dentro de la industria farmacéutica y posibles revalidaciones del mismo.

## **2.2. Bases Teóricas:**

### **2.2.1 INYECTABLES**

El término parenteral hace referencia a la vía de administración de los fármacos. Atravesando una o más capas de la piel o de las membranas mucosas usando la gravedad o la fuerza mediante una inyección. La vía parenteral es diariamente empleada en atención primaria en multitud de situaciones. Los artículos parenterales están preparados escrupulosamente por

métodos diseñados para asegurar que cumplan los requerimientos farmacopéicos para la esterilidad y pirógenos principalmente, entre otros. Una inyección es una preparación intencionada para la administración parenteral y/o para reconstituir o diluir antes de su administración.(13)

### 2.2.2 VIAS DE ADMINISTRACION PARENTERALES

Se refiere a todas aquellas vías en las que se evita el paso por el aparato digestivo, con especial referencia a los “inyectables”. Según Goodman&Gilman (1996).

-Intravenosa: vía parenteral por excelencia, dado que existe una suficiente cantidad de venas superficiales de buen calibre (accesibles). Implican la disolución del fármaco en un líquido (generalmente agua) o vehículo, junto con el cual se administra directamente en la circulación por lo que no se produce el proceso de absorción.

-Intramuscular: gracias a la amplia vascularización del tejido muscular, puede administrarse allí una droga, la cual pasara a la circulación por los capilares. Esta administración suele retardar un poco la absorción, por lo que se considera la posibilidad de formación de depósitos de las drogas administradas, las cuales se ven liberando lentamente a la sangre.

-Subcutánea: se explota la existencia de una rica red capilar en el tejido subcutáneo; suele ser más rápida que la intramuscular.

-Epidular - Intratecal: vías especiales, de uso más localizado, cuando se requiere evitar el paso por una barrera hemato encéfalica para causar un efecto en el SNC.



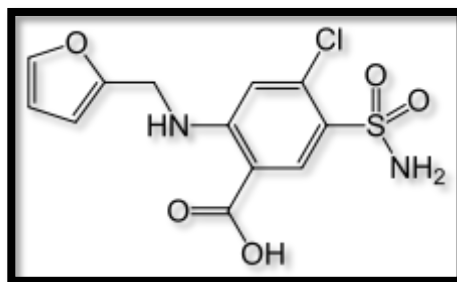
-Intraarterial: se puede considerar equivalente a la intravenosa, exceptuando por la menor accesibilidad de las arterias a la punción. La administración intracardiaca es una forma especial de la intraarterial, limitada a muy pocos casos.

### 2.2.3 FUROSEMIDA, INYECCIÓN.

#### 2.2.3.1 Monografía oficial USP 38

La inyección de Furosemida es una solución estéril de Furosemida en agua para inyección preparada con la ayuda de Hidróxido de Sodio, o si está destinada exclusivamente al uso veterinario, con la ayuda de Dietanolamina o Monoetanolamina. Contiene no menos de 90,0 por ciento y no más de 110,0 por ciento de la cantidad declarada de Furosemida (C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S).

Figura N°1 fórmula estructural de Furosemida



Fuente:<https://es.wikipedia.org/wiki/Furosemida>

Envasado y almacenamiento—Conservar en envases monodosis o multidoses de vidrio tipo I, resistentes a la luz.

Etiquetado—La etiqueta debe indicar si la inyección está destinada exclusivamente al uso veterinario.

Estándares de referencia USP <11>--ER Endotoxinas USP. ER Furosemida USP. ER Compuesto Relacionado A de Furosemida USP. ER Compuesto Relacionado B de Furosemida USP.

Identificación—Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL un volumen de inyección que equivalga aproximadamente a 40 mg de Furosemida, diluir a volumen con agua y mezclar. Diluir a volumen 2,0 mL de esta solución con hidróxido de sodio 0,02 N en un segundo matraz volumétrico de 100 mL y mezclar. Disolver aproximadamente 10 mg de ER Furosemida USP en 6,0 mL de hidróxido de sodio 0,1 N en un matraz volumétrico de 25 mL y diluir a volumen con agua. Diluir cuantitativamente 2,0 mL de la solución resultante con hidróxido de sodio 0,02 N para obtener una solución estándar de una concentración aproximada de 8 µg por mL. Determinar concomitantemente el espectro de absorción UV de ambas soluciones: los espectros de absorción UV así obtenidos presentan máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda.

Endotoxinas bacterianas <85>—No contiene más de 3,6 Unidades USP de Endotoxinas por mg de Furosemida.

pH <791> — Entre 8,0 y 9,3 o, cuando la etiqueta indica que el producto está destinado exclusivamente al uso veterinario, entre 7,0 y 7,8 si contiene Dietanolamina, o entre 8,0 y 9,3 si contiene Monoetanolamina.

Partículas <788> — Cumple con los requisitos para inyecciones de pequeño volumen.

Límite de compuesto relacionado B de Furosemida—NOTA—proteger las soluciones de Furosemida de la exposición de la luz [Fase móvil, solución de dilución, solución de aptitud del sistema y sistema cromatográfico—preparar según se indica para la prueba de compuestos relacionados en Furosemida.]

Solución estándar—preparar una solución en la Solución de dilución que contenga 10,0 µg de ER compuesto relacionado B de Furosemida USP por mL. Solución de prueba—transferir a un matraz volumétrico de 10 mL un volumen de inyección, medido con exactitud, que equivalga aproximadamente a 10 mL de Furosemida, agregar Solución de dilución a volumen y mezclar. Procedimiento—inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µL) de la solución estándar y de la solución de prueba, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. La respuesta a 254 nm obtenida para cualquier pico observado en el cromatograma de la solución de prueba con un tiempo de retención correspondiente al del Estándar de Referencia en la solución estándar no es mayor que la respuesta a 254 nm obtenida para el pico en el cromatograma de la solución estándar, correspondiendo a no más de 1,0 % del compuesto relacionado B de la Furosemida. Cuando la etiqueta indica que la inyección está destinada exclusivamente al uso veterinario, la respuesta a un tiempo de retención correspondiente al del Estándar de Referencia de la solución estándar, no

supera en más de 2,5 veces la respuesta a 254 nm obtenida para el pico en el cromatograma de la solución estándar, correspondiendo a no más de 2,5 % del compuesto relacionado B de la Furosemida.

Otros requisitos—cumple con los requisitos en Inyectables <1>.

Valoración— [NOTA—proteger las soluciones de Furosemida de la exposición a la luz.] Fase móvil, solución de dilución, solución de aptitud del sistema y sistema cromatográfico—preparar según se indica para la prueba de compuestos relacionados en Furosemida. Preparación estándar—disolver una cantidad de ER Furosemida USP, pesada con exactitud, en la Solución de dilución para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 1,0 mg por mL, agregar solución de dilución a volumen y mezclar. Procedimiento—inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20  $\mu$ L) de la preparación estándar y la preparación de valoración, registrar los cromatogramas y medir la respuestas correspondientes a los picos. Empleando la respuesta a 254 nm, calcular la cantidad, en mg, de Furosemida ( $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$ ) por mL de la inyección tomado, por la fórmula:  $10(C/V)(r_u/r_s)$

En donde C es la concentración, en mg por mL, de ER Furosemida USP en la preparación estándar; V es el volumen, en mL, de inyección tomado; y  $r_u$  y  $r_s$  son las respuestas de los picos obtenidas con la preparación de valoración y la preparación estándar respectivamente.

## 2.2.4 Información farmacológica

### 2.2.4.1 Forma farmacéutica: Solución inyectable (IM-IV)

### 2.2.4.2 Datos clínicos:

Indicaciones terapéuticas:

Hipertensión acompañada de una afectación visceral que ponga en peligro el pronóstico vital a muy corto plazo (emergencia hipertensiva), en particular en caso de:

Encefalopatía hipertensiva,

Descompensación ventricular izquierda con edema pulmonar.

Urgencias cardiológicas: edema pulmonar agudo, asistolia.

Retención de sodio grave de origen cardíaco, renal, cirrótico.

Puede utilizarse en reanimación pediátrica.

### 2.2.4.3 Posología y forma de administración:

En el tratamiento de la emergencia hipertensiva, la dosis deberá adaptarse de modo que la reducción de la presión arterial no supere el 25% del nivel inicial durante la hora posterior al inicio del tratamiento inyectable; de hecho, una caída demasiado brusca de la presión puede permitir una isquemia miocárdica, cerebral o renal.

Adultos Vía parenteral: De 2 a 3 ampollas diarias por vía I.V. lento por vía I.M.: - Para tratar un edema pulmonar agudo, es posible volver a administrar la inyección en caso de un resultado insatisfactorio. - Es posible efectuar una nueva administración por vía oral en cualquier momento del tratamiento 3 horas después de una inyección de Furosemida. Niños Vía IV: 0,5 a 1 mg/kg diarios.

#### 2.2.4.4 Propiedades farmacológicas

Propiedades farmacodinámicas Diurético de Asa. Código del Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (ATC): C03CA01

Acción diurética natriurética: A las dosis terapéuticas habituales, la furosemida actúa principalmente al nivel de la rama ascendente del asa de Henle o inhibe la reabsorción del cloro y, como resultado, del sodio. Posee una acción complementaria al nivel del túbulo proximal y del segmento de dilución. Además, incrementa el flujo sanguíneo renal para beneficio de la zona cortical. Esta propiedad es especialmente interesante en caso de asociación con los betabloqueantes que pueden ejercer un efecto inverso. No altera la filtración glomerular (en ciertas circunstancias, se ha podido constatar un incremento de ésta). La acción diurética natriurética aumenta en 2proporción a las dosis administradas y persiste en caso de insuficiencia renal.

Acción antihipertensora y otras acciones: Posee una acción hemodinámica que se caracteriza por la

disminución de la presión capilar pulmonar incluso antes de la aparición de diuresis, y por el incremento de la capacidad de almacenamiento del lecho vascular venoso constatado por pletismografía (estas propiedades se han estudiado de forma más detallada por vía IV). La furosemida se utiliza para tratar todas las formas de retención hidrosalina con una respuesta proporcional a la dosis. La furosemida ejerce una acción antihipertensora debida a la reducción de sodio y a la acción hemodinámica.

#### 2.2.4.5 Propiedades farmacocinéticas

Tras la administración parenteral, la eliminación se realiza esencialmente por la orina. El efecto diurético natriurético se observa a partir de los 5 minutos posteriores a la administración intravenosa. La semivida de eliminación media es de una hora, aproximadamente. Esta semivida es mayor en los bebés prematuros. La eliminación digestiva (biliar) es mayor en caso de insuficiencia renal. Por esto, no se produce acumulación del producto. La furosemida se excreta en la leche materna.

#### 2.2.4.6 Contraindicaciones:

Este medicamento no debe administrarse en caso de:

Insuficiencia renal aguda funcional.

Encefalopatía hepática.

Alergia a las sulfamidas.

Obstrucción en las vías urinarias en caso de oliguria.

Hipovolemia o deshidratación.

Lactancia.

En pacientes sometidos a hemodiálisis y con insuficiencia renal grave, será necesario eliminar la hepatitis en evolución y la insuficiencia hepatocelular grave, ya que debido a la insuficiencia renal asociada la eliminación se realiza por vía biliar, por lo que existe riesgo de acumulación. En general, no se recomienda el uso de este medicamento durante el embarazo ni tampoco en asociación con litio o sultoprida.

#### 2.2.4.7 Advertencias:

La toma accidental de furosemida puede conllevar hipovolemia con deshidratación. En pacientes con insuficiencia hepatocelular, el tratamiento deberá administrarse con prudencia bajo control hidroelectrolítico estricto dado el riesgo de encefalopatía hepática. Si se produjera, el tratamiento deberá interrumpirse inmediatamente. El incremento hipertensivo que suele acompañar a los accidentes cerebrovasculares no suele constituir una indicación para el tratamiento antihipertensor de emergencia. La decisión debe tomarse en función de la presencia de complicaciones viscerales que pongan en peligro el pronóstico vital a corto plazo.



Interacción con otros medicamentos y otras formas de interacción Asociaciones no recomendadas:

- Litio: incremento de la litemia con signos de sobredosis, como en caso de una dieta sin sodio (disminución de la eliminación urinaria de litio).

Si no es posible evitar la asociación, será necesario efectuar un control estricto de la litemia y adaptar la posología.

- Sultoprida: incremento del riesgo de trastornos del ritmo ventricular, en concreto torsades de pointes (la hipopotasemia es un factor contributivo). Control clínico, biológico y electrocardiográfico.

Asociaciones que requieren precauciones de empleo:

- AINE (vía sistémica), incluyendo los inhibidores selectivos de la COX-2, el ácido acetilsalicílico, etc.: insuficiencia renal aguda en enfermos de riesgo (ancianos o deshidratados) por disminución de la filtración glomerular (inhibición de las prostaglandinas vasodilatadoras debido a los AINE).

- Hipopotasemiantes: amfotericina B (vía IV), gluco y mineralocorticoesteroides (vía sistémica), tetracosactida, laxantes estimulantes: incremento del riesgo de hipopotasemia (efecto aditivo).

- Digitálicos: hipopotasemia que favorece los efectos tóxicos de los digitálicos.

- Diuréticos ahorradores de potasio (amilorida, canreonato de potasio, espironolactona, triamtereno): la asociación racional, útil en determinados pacientes, no

excluye la aparición de hipopotasemia o, en particular en pacientes con insuficiencia renal y diabéticos, la hiperpotasemia.

- Aminoglucósidos (vía parenteral): incremento de los riesgos nefrotóxicos y ototóxicos de los aminoglucósidos (insuficiencia renal funcional relacionada con la deshidratación provocada por el diurético). La asociación se permite bajo control del estado de hidratación y de las funciones renales y cocleovestibulares y, llegado el caso, de las concentraciones plasmáticas del aminoglucósido.

- Fenitoína: disminución del efecto diurético que puede alcanzar el 50%. Es posible utilizar dosis superiores de diurético.

- Carbamazepina: riesgo de hiponatremia sintomática

- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), antagonistas de la angiotensina II: riesgo de hipotensión arterial extrema o insuficiencia renal aguda por el inicio del tratamiento con un IECA o un inhibidor de la angiotensina II, en caso de deshidratación isotónica preexistente.

- Metformina: acidosis láctica debida a la metformina desencadenada por una posible insuficiencia renal funcional relacionada con los diuréticos y, más concretamente, los diuréticos de asa. No utilizar metformina si la creatinemia es superior a 15 mg/litro (135  $\mu$ mol/litro) en hombres y 12 mg/litro (110  $\mu$ mol/litro) en mujeres.

- Medios de contraste yodados: en caso de deshidratación provocada por diuréticos aumenta el riesgo de insuficiencia renal aguda, en particular al utilizar dosis importantes de medios de contraste yodados.

- Baclofeno: incremento del efecto antihipertensor. Control de la presión arterial y adaptación posológica del antihipertensor si es necesario.

Asociaciones a tener en cuenta:

- Corticoesteroides, tetracosactida (vía sistémica) (salvo hidrocortisona empleada como tratamiento sustitutivo en la enfermedad de Addison): reducción del efecto antihipertensor (retención hidrosalina de los corticoesteroides).

- Neurolépticos, antidepresivos imipramínicos (tricíclicos): Incremento del efecto antihipertensor y el riesgo de hipotensión ortostática (efecto aditivo).

- Amifostina: Incremento del efecto antihipertensor.

- Calcio (sales de): Riesgo de hipercalcemia por la disminución de la eliminación urinaria del calcio.

- Ciclosporina: Riesgo de incremento de la creatininemia sin modificación de las concentraciones plasmáticas de ciclosporina, incluso en ausencia de deshidratación isotónica.

#### 2.2.4.8 Embarazo y lactancia:

Los estudios efectuados en animales han puesto de manifiesto un efecto teratógeno. - En clínica, no se dispone de datos lo bastante pertinentes para evaluar una posible malformación o fetotoxicidad de la furosemida al administrarla durante el embarazo. Por regla general, la furosemida no debe administrarse en mujeres embarazadas y no debe recetarse nunca en casos de edema fisiológico del embarazo (que, por lo tanto, no requieren tratamiento). En efecto, los diuréticos pueden provocar isquemia fetoplacentaria, con riesgo de hipotrofia fetal. No obstante, los diuréticos (en forma oral) siguen siendo un elemento esencial del tratamiento de los edemas de origen cardíaco, hepático y renal en embarazadas.

Lactancia: La furosemida se excreta en la leche materna. Los diuréticos de asa reducen la secreción láctica y la lactancia se inhibe a partir de una dosis única de 40 mg. Por consiguiente, el uso de este medicamento está contraindicado en mujeres en período de lactancia.

#### 2.2.4.9 Reacciones adversas:

Ocasionalmente, durante el tratamiento puede producirse un incremento discreto de la uricemia (del orden de 10 a 30 mg/l), y de forma excepcional un ataque de gota. A veces se observa un incremento de la glucemia, con frecuencia durante la administración corta e intensa sobre todo por vía intravenosa. Sólo se han descrito casos excepcionales de disminución de la tolerancia a la glucosa. Es posible observar alteraciones hidroelectrolíticas en relación con la actividad del producto: deshidratación, hiperazotemia, hiponatremia, hipovolemia acompañada de hipotensión ortostática que justifica la suspensión del medicamento o la reducción de la posología. La asociación a una dieta sin sodio demasiado estricta favorece estas alteraciones.

Es posible observar algunas hipopotasemias asociadas o no a alcalosis metabólica. Suelen ser más frecuentes al utilizar dosis altas o en pacientes cirróticos, desnutridos o con insuficiencia cardíaca. Estas hipopotasemias pueden ser especialmente graves en pacientes con insuficiencia cardíaca y, por otro lado, pueden comportar trastornos graves del ritmo, en particular torsades de pointes (potencialmente mortales), sobre todo en asociación con antiarrítmicos del grupo de la quinidina. Se han observado algunos casos infrecuentes de calcificaciones renales asociadas a hipercalciuria en bebés muy prematuros tratados con dosis altas de furosemida inyectable, en caso de cardiopatía congénita con insuficiencia cardíaca. En caso de insuficiencia hepatocelular, existe la posibilidad

de desencadenamiento de encefalopatía hepática. Se han constatado algunos casos infrecuentes de reacciones cutáneas ocasionalmente ampollares, dolores lumbares, leucocitopenias y trombocitopenias. Posibilidad de trastornos digestivos. La administración de dosis muy altas de furosemida inyectable, en particular cuando no se ha observado la velocidad de inyección recomendada (de 4 a 6 minutos para la inyección IV directa o 4 mg por minuto para la infusión), puede provocar reducciones transitorias de la agudeza auditiva y, en asociación con un antibiótico del grupo de los aminoglucósidos, ototóxicos, se han observado algunos casos infrecuentes de afectaciones definitivas de forma excepcional.

#### 2.2.5 Las Bacterias Gram Negativas

La pared celular es la capa rígida que da forma a la bacteria y que cubre la membrana citoplasmática, protegiéndola de la lisis osmótica y de sustancias tóxicas.

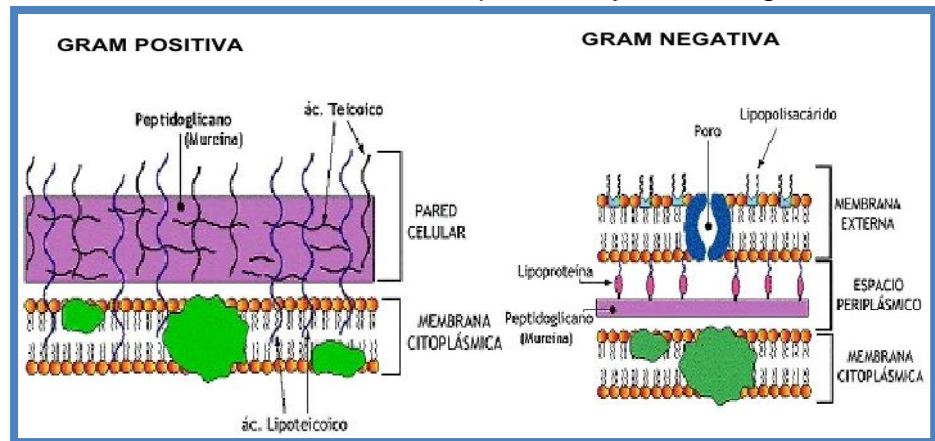
La tinción Gram el cristal violeta actúa como tinción primaria uniéndose a la pared celular bacteriana después de un tratamiento con una solución yodo-yodurada que sirve como mordiente para unión del colorante. Debido a la naturaleza de su pared celular, las bacterias Gram positivas tienen la habilidad de retener el cristal violeta aun después de decoloración con solución orgánica (alcohol- acetona) viéndose azul-violeta al microscopio.

Las bacterias Gram negativas pierden la tinción del cristal violeta al decolorarse debido al alto contenido lipídico de su pared celular y posteriormente captan la coloración de la safranina viéndose rojas al microscopio. Otro grupo de bacterias al cual pertenecen las micobacterias son denominadas bacterias alcohol-ácido resistente, están cubiertas de un grueso material céreo que resiste la tinción pero una vez teñidas con carbolfucsina resisten la decoloración con solventes orgánicos fuertes como alcohol - ácido.(7)

La diferencia estructural entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas se puso de manifiesto con el desarrollo del microscopio óptico de transmisión: la pared celular Gram positiva está formada por una única capa homogénea de 20 a 80nm de espesor (figura 4), por el contrario, la pared de la célula Gram negativa es bastante compleja pues posee una capa de peptidoglicano de 2 a 7 nm de grosor rodeada por Espacio Periplásmico Peptidoglucano

Membrana plasmática una membrana externa de 7 a 8nm), se observa además un espacio entre la membrana plasmática y la membrana externa denominado espacio periplásmico que es más pequeño en las bacterias Gram positivas. (6) La estructura de la pared celular de las bacterias Gram negativas hacen que se decoloren y tomen el color de la safranina viéndose rosadas al microscopio. Las bacterias Gram negativas presentan una pared celular mucho más compleja y en ella una sustancia lipopolisacárida: la endotoxina bacteriana que es un componente tóxico de gran importancia en la industria de productos parenterales.

Figura N°-2: Dibujo de las diferencias entre las envolturas celulares de las bacterias Gram positivas y Gram negativa.



Fuente: <http://es.slideshare.net/TraviesoCarmesi/1-generalidades-de-bacterias>

#### 2.2.6 Los componentes de la pared celular de las BGN son:

1. Capa de peptidoglicano: da forma a la bacteria y previene de lisis osmótica.
2. Membrana externa : estructura de bicapa lipídica exclusiva de las bacterias Gram negativas que se encuentra en la superficie externa de la bacteria, compuesta de fosfolípidos, lipoproteínas, lipopolisacáridos (LPS) y diversas proteínas, como las purinas o canales proteicos. Los LPS de la membrana externa son únicos y específicos de las bacterias Gram negativas, y son las responsables de las propiedades biológicas.
3. Espacio periplásmico - Periplasma: Se encuentra entre la membrana externa y la membrana citoplásmica. Contiene al periplasma que es un material gelatinoso, contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias (3).



### 2.2.7 Historia de las endotoxinas

La historia de las endotoxinas bacterianas se remonta al siglo pasado. En 1892, Richard Pleiffer, descubrió que el *Vibrio cholerae*, microorganismo causante del cólera, sintetizaba una sustancia resistente al calor, que solo se liberaba al exterior cuando este se desintegraba.

Por ser una toxina que pertenece al interior de la bacteria la denominó "endotoxina", término que es inexacto puesto que las endotoxinas residen en la superficie de la bacteria y no en su interior.

Simultáneamente los estudios de Centanni condujeron a la obtención de una toxina termoestable a partir de *Salmonellatyphi*, a la cual determinó "pirotoxina". La endotoxina de Pleiffer y la pirotoxina de Centanni resultaron básicamente idénticas.

En la década de los treinta, Boivin y Co, trabajando con extractos relativamente impuros, coincidieron en que la endotoxina termoestable de todas las bacterias gram negativas estudiadas contienen en su estructura un polisacárido, un lípido y una proteína, elucidando así una aproximación a la composición real de las endotoxinas.

Continuando estas investigaciones, Wesphal y Luderitz desarrollaron una técnica que permitió obtener a partir de bacterias gran cantidad de extracto tóxico, muy puro, constituido por un lípido y un polisacárido junto con fósforo. Este resultado indicó que las moléculas debían ser prácticamente idénticas desde el punto de vista químico. A partir de entonces el término pirotoxinas cayó en desuso y se empleó instantáneamente el de endotoxinas o lipopolisacáridos. Además contribuyeron a demostrar que todas

las bacterias gram negativas producen endotoxinas. Según Morrison (1992).

A medida que progresaban los trabajos estructurales se acumulaban las pruebas que apoyaban las pruebas de un lípido A responsable, a la vez de las alteraciones producidas por las endotoxinas, así como el refuerzo de la inmunidad. Quedo de esta manera demostrado que la cadena polisacarida (antígeno o/y núcleo) no era necesaria para la toxicidad ni la inducción de la fiebre. Según Mills (1976).

En 1983, Zohriner y Col, descifraron la estructura complementa del lípido A de E. coli. Simultáneamente un grupo de investigadores de la universidad de Wisconsin determinaron la organización estructural del lípido A en la Salmonella typhimurium resultando ser idéntico al de la E. coli. Kusumoto y Col en 1984 sintetizaron químicamente el lípido A de E. coli. Demostraron poseer las mismas propiedades del lípido A natural.

#### 2.2.8 Pirógenos:

Endotoxinas bacterianas La palabra pirógeno se deriva de los vocablos: piro = fuego y gen = origen. Las primeras observaciones de reacciones pirogénicas datan de 1911 por Wechbelman quien describió ocasionales aumentos de temperatura y escalofríos en pacientes a quienes les administraba Arsfenamia por inyección intravenosa. Posteriormente Hart y Peridolf comprobaron que la inyección de agua destilada en un aparato de vidrio no producía fiebre si se administraba recién destilada. En 1923 Sieber evidenció que las fiebres descritas por Wechbelman se originaban por presencia de sustancias de origen bacteriano, dando el nombre

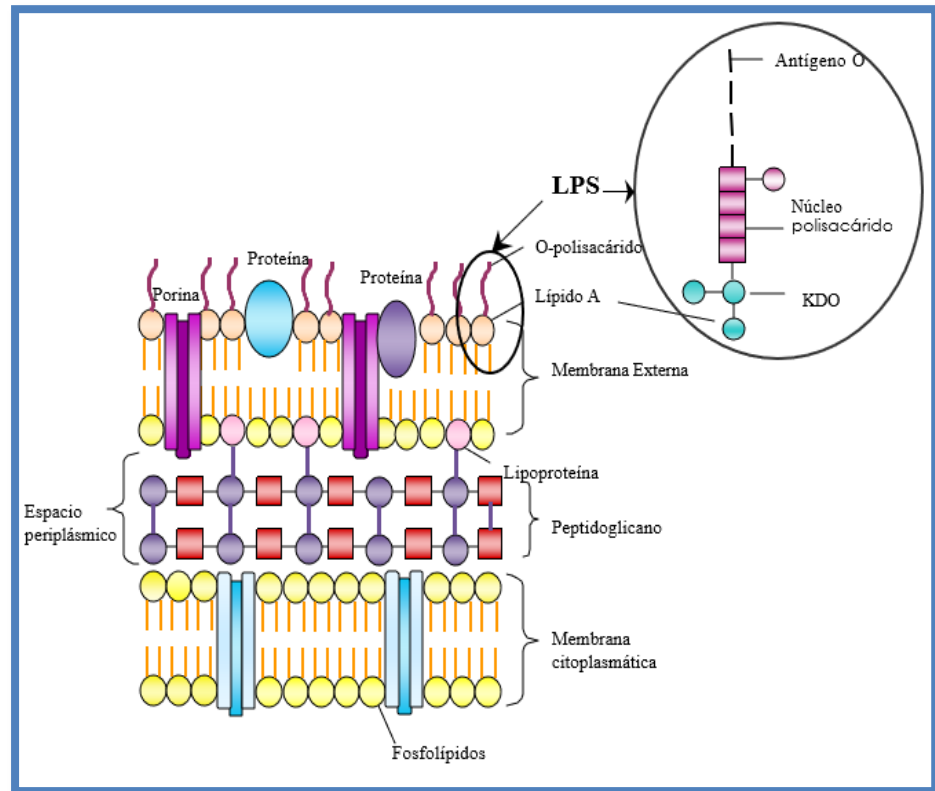
de pirógenos, estableciendo que dichas sustancias podían ser bacterias muertas, intactas o desintegradas o generalmente productos del metabolismo bacteriano. Sus experiencias le condujeron a desarrollar la prueba de pirógenos en conejos. (4)

Las bacterias Gram positivas, mico bacterias, hongos e incluso virus pueden producir sustancias pirogénicas, sin embargo los pirógenos producidos por las bacterias Gram negativas, las —Endotoxinas poseen actividad pirogénica mayor que la de cualquier otra sustancia, es por ello que se ha generalizado que la ausencia de endotoxinas en un inyectable, indica ausencia de compuestos pirogénicos en general.

Las endotoxinas bacterianas son complejos de lipopolisacáridos (LPS) de alto peso molecular que constituyen el principal componente de la pared celular de las bacterias Gram negativas patógenas o no patógenas tales como E. Coli, Shigella, Pseudomonas, Neisseria, Haemophilus y otros.

Las células viables producen pequeñas cantidades de endotoxinas durante su vida, pequeñas cantidades pueden ser liberadas en forma soluble especialmente por los cultivos jóvenes, sin embargo la mayor cantidad tiene lugar después de la muerte y lisis de la célula bacteriana. (2) Durante casi 100 años, el término endotoxina ha descrito una toxina termoestable, pirógena y potencialmente letal de las bacterias Gramnegativas que se había constituido en una plaga para la Industria farmacéutica pues la administración de fármacos contaminados con éstas producía complicaciones e incluso la muerte de los pacientes. (2)(4)

Figura N°3: Estructura química de la pared celular de la bacteria Gram negativo, se aprecia el complejo lipopolisacarido LPS y sus partes.



Fuente: Dibujado por J. Solís a partir de "The Grapes of Staph" A Microbiology Lab Manual

<http://www.cat.cc.md.us/courses/biol230labmanua> 1999 Gary E. Kaiser, Acceso 15-11-03

### 2.2.9 Regiones de las Endotoxinas Bacterianas:

Las endotoxinas tienen tres regiones denominadas como I, II y III.

Región I: El lípido A es el componente lipídico, es la región hidrofóbica del LPS, consiste en un disacárido de N-acetilglucosamina (NAG) fosforilada con 6 a 7 ácidos grasos

saturados. La estructura del lípido A es muy similar entre las bacterias Gramnegativas.

Región II: Se encuentra unida a la posición 6 de un NAG. El antígeno R consiste en una corta cadena de azúcares. Se consideran 2 subregiones: La fracción del núcleo interno: Se encuentran 2 carbohidratos típicos de las bacterias Gramnegativas: el ácido 2-ceto-3-deoxioctonoico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa. El KDO es único y siempre presente en LPS y constituye un indicador de endotoxinas.

La fracción del núcleo externo: Esta constituido a base de hexosas (glucosa, galactosa), NAG, y a veces algunas hexosas más raras. Con algunas variaciones ligeras, el polisacárido es común en todos los miembros de las bacterias del género Salmonella, pero es estructuralmente diferente en otros géneros de bacterias Gramnegativas. Los géneros de Salmonella, Shigella y Escherichia tienen su parte polisacárida similar pero no idéntica.

Región III: Se encuentra unido al polisacárido R. Consiste en subunidades repetidas de oligosacáridos de 3 a 4 azúcares. Las cadenas individuales varían en longitud hasta más de 40 unidades repetidas. El polisacárido es más grande que el núcleo polisacárido y mantiene el dominio hidrofílico del LPS, es el principal determinante antigénico de la pared celular. (6)

Con la finalidad de protegerse de una infección, la primera medida de nuestro organismo es detectar la presencia de microorganismos extraños, reconociendo moléculas no asociadas a células humanas. Estas moléculas infecciosas se unen a un receptor promoviendo la liberación de proteínas de defensa denominadas citoquinas. Este principio también se aplica en las endotoxinas. La secuencia de la reacción

pirogénica (Ver figura N° 3) es la siguiente: El lipopolisacárido (LPS) es liberado de la membrana externa de su pared celular por lisis de la bacteria (el LPS puede encontrarse por ejemplo en un producto inyectable contaminado y llega al torrente sanguíneo durante la administración); se une a una proteína de unión al LPS, formándose un complejo —LPS-Proteína de unión, este complejo viaja a través de la sangre y se une al receptor CD14 ubicado en la superficie de los macrófagos; (este es el mecanismo normal de defensa por el cual el organismo reconoce que hay invasión por bacterias). Los macrófagos se activan liberando moléculas de defensa, las citoquinas. Las citoquinas se unen a sus receptores en células específicas produciéndose mediadores inmunológicos de defensa innatos como, fiebre, inflamación, fagocitosis. Si se liberasen gran cantidad de citoquinas, se produciría daño a nivel de vasos sanguíneos, disfunción respiratoria, destrucción de tejidos, hipotensión, shock y muerte.

#### 2.2.10 Mecanismo de la fiebre

El LPS posee escasa bioactividad directa, pero es una señal molecular que induce a los macrófagos para que produzcan pirógenos endógenos los cuales a su vez inducen la producción de mediadores como las prostaglandinas que actúan directamente sobre los centros de control de temperatura del cerebro. Estos pirógenos endógenos incluyen: IL -1 (Interleucina 1), TNF -  $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral alfa), IL - 6, etc. Las tres primeras citoquinas inducen fiebre a través de la inducción de síntesis de prostaglandinas (PG- E2) las cuales actúan en forma directa sobre los centros de fiebre en el hipotálamo. Las prostaglandinas también causan aumento de la permeabilidad vascular.(2)

### 2.2.11 Toxinas bacterianas

Existen dos tipos de toxinas bacterianas: las exotoxinas y las endotoxinas. El término endotoxinas se emplea para describir las actividades tóxicas que se relacionan con componentes de la cubierta bacteriana. Suele referirse a las actividades de la parte del lípido A en el Lipopolisacárido (LPS) de bacterias Gram negativas. Las endotoxinas llevan el sufijo —endoll porque forman parte de la estructura de la bacteria, mientras que a las exotoxinas se les antepone —exoll porque son productos bacterianos no estructurales que se liberan al ambiente. Las exotoxinas son proteínas (a menudo enzimas) solubles, termolábiles que el microorganismo patógeno libera en su microambiente durante su crecimiento. Son sintetizados por agentes patógenos específicos que poseen plásmidos o profagos que transportan los genes codificadores de la exotoxina, son proteínas termolábiles que se inactivan entre los 60 y 80° C son tóxicas en dosis pequeñas ( $\mu\text{g/g}$  por ejemplo con la toxina del botulismo), estimulan la producción de anticuerpos (antitoxinas), son incapaces de producir fiebre y se clasifican como neurotoxinas, citoxinas o enterotoxinas según su mecanismo de acción. (6) Las endotoxinas están presentes en la pared externa de las bacterias Gram negativas. Se denominan así porque están ligadas a la bacteria y se liberan cuando el microorganismo es destruido, parte de las endotoxinas también se liberan durante la multiplicación bacteriana. Son termoestables, tóxicas en dosis elevadas, por lo general las endotoxinas se liberan en forma de burbujas de membrana externa, fuertemente impregnadas con LPS; estas burbujas activan los complementos a través de la vía alterna y conducen a la formación de interleucina I, factor de necrosis tumoral, factor activador de plaquetas, óxido nítrico y otras

moléculas efectoras que causan la fiebre, la trombosis y la hipotensión características de la sepsis.

#### 2.2.12 PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA

Durante la elaboración de productos inyectables hay que tomar todas las medidas concebibles para evitar la contaminación pirogénica, así como disponer de un ensayo confiable de control en el producto terminado. En los últimos años, los principales organismos reguladores de productos farmacéuticos (Farmacopeas) exigen cada vez más en sus monografías la aplicación del método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la liberación de pirógenos en productos terminados parenterales. El análisis de pirógenos constituye uno de los principales ensayos en el control de calidad de la fabricación de inyectables por su repercusión en la salud humana, puesto que la presencia y administración de los mismos, es capaz de provocar una serie de respuestas fisiológicas, en su mayoría de carácter perjudicial y en casos extremos, la muerte del paciente. Por las razones anteriores, existe un creciente interés en el conocimiento y dominio de estos métodos. Por más de 40 años el ensayo de pirógenos mediante la determinación de la respuesta febril en conejos, permaneció prácticamente invariable y su efectividad fue escasamente cuestionada. En la actualidad, para la aprobación y comercialización de gran parte de los productos farmacéuticos y biotecnológicos diseñados para ser administrados por vía parenteral, las principales instituciones reguladoras internacionales exigen el control de pirógenos por el método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). El LAL es un método in vitro que detecta con alta sensibilidad la presencia de endotoxinas bacterianas. (7)



La prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL), cuando es utilizada de acuerdo a las directivas de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, (21) puede reemplazar la prueba de pirógenos (prueba de fiebre de conejos) de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP), para el control de producto terminado de —drogas inyectables para uso humano (incluyendo productos biológicos), drogas inyectables para uso animal y dispositivos médicos. La prueba oficial a la que se hace referencia en monografías específicas de la USP es la Prueba de Endotoxinas Bacterianas de la USP (USP Bacterial Endotoxins Test) (11) Ante las disposiciones de las Farmacopeas e Instituciones Reguladoras Internacionales, el ensayo del LAL gana cada vez más el interés de la Industria Farmacéutica y Biotecnológica nacional. Teniendo en cuenta además el notable desarrollo que ha alcanzado el método y su importancia para el cumplimiento de las Buenas Prácticas en el proceso de fabricación de inyectables, se presenta a continuación parte de su historia y el desarrollo de la prueba.

#### 2.2.13 Historia reactivo LAL

La historia del descubrimiento del reactivo LAL comienza en 1956, cuando el doctor Frederick B. Bang reporta la muerte por coagulación intravascular en el cangrejo herradura americano *Limulus polyphemus*. Bang, junto a Jack Levin, revela en 1964 que las endotoxinas son el vector causante de la coagulación de la hemolinfa del *Limulus*. Cuatro años más tarde, estos investigadores comprueban que los elementos responsables de la coagulación inducida por endotoxinas son de naturaleza enzimática, y se encuentran dentro de los amebocitos, único tipo de células presentes en la hemolinfa azul de los cangrejos

herraduras. Por lo tanto, el reactivo LAL es un extracto acuoso de los amebocitos, compuesto por una cascada de enzimas serino proteasas tipo tripsina capaz de reaccionar frente a pequeñas cantidades de endotoxinas. La bioquímica de la reacción del LAL se conoce en detalle y el mecanismo en cascada parece ser el responsable de su extraordinaria sensibilidad. (2)

El *Limulus* habita en algunos puntos de la costa del Atlántico de los Estados Unidos hasta el Golfo de México, existen otras 3 especies de cangrejos herraduras oriundos del continente asiático: el *Tachypleustridentatus*, el *Carcinos corpiusrotundicauda* y el *Tachypleus gigas*.

Estos animales son artrópodos marinos muy conocidos por su récord fósil debido a que evolucionaron muy poco en los últimos 300 millones de años.

Las células sanguíneas circulantes (amebocitos) del sistema circulatorio [hemolinfa] presentes en ciertas especies de Limulidos, en especial el cangrejo bayoneta (*Limulus polyphemus*) y el cangrejo japonés (*Tachypleiustridentatus* spp.) contienen gránulos de proteína que se gelifica en la presencia de endotoxina de muchas especies de Gram negativos.

El hemocito granular o amebocito es la principal célula circulante en el cangrejo adulto. Se caracteriza por contener gránulos grandes y pequeños: los gránulos mayores contienen 4 factores de coagulación y un factor antimicrobiano (factor anti LPS), se liberan más rápidamente que los pequeños, ambas poblaciones se liberan por exocitosis y coagulación, con un lapso de aproximadamente de 90 seg. El mecanismo de reacción se basa en enzimas con actividad de proteasas de

serina en forma de zimógenos (factores C, B, una enzima procoagulante, y el coagulógeno). Esta reacción ha sido empleada como la base de un ensayo cualitativo o semicuantitativo para endotoxina, siendo el reactante la proteína obtenida de los amebocitos lisados de *Limulus*, ensayo conocido como Lisado de Amebocito de *Limulus* (LAL). El objetivo final de este ensayo es la detección de la gelificación de la proteína después de ser incubada con endotoxina bajo ciertas condiciones.

Figura N°4: Imagen del cangrejo de la herradura.



Fuente:<http://zeppelindreams.com/zepshop/es/criaturas-increibles/305-cangrejo-de-herradura-0095866261405.html>

#### 2.2.13.1 Principios Biológicos.

El sistema de coagulación de *Limulus polyphemus* está contenido en los amebocitos, y las proteínas derivadas de los amebocitos lisados se coagulan en presencia de la endotoxina, siendo la ruta de esta reacción dependiente de la concentración de endotoxina. Bang y Levine fueron los primeros en sugerir que la gelación inducida por endotoxina era mediada enzimáticamente. El mecanismo de reacción se cree que implica la activación de una enzima procoagulante por  $\text{Ca}^{2+}$  y

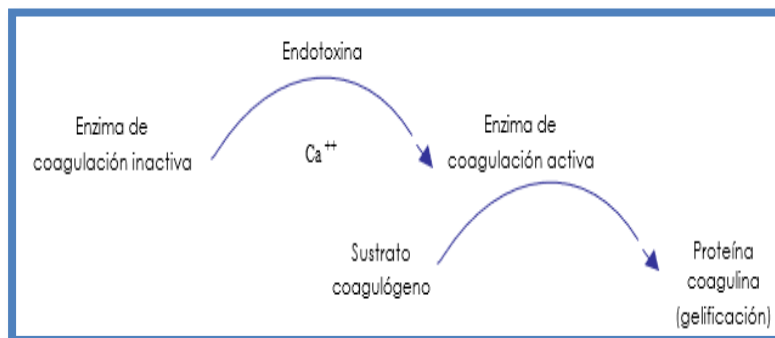
endotoxina. Esta enzima activada cataliza la ruptura hidrolítica de una proteína coagulable [coagulígeno] a subunidades polipeptídicas. La naturaleza química del coagulígeno ha sido estudiada en las dos especies de limúlidos descritos: en el cangrejo bayoneta, el coagulígeno es un polipéptido de 235 residuos de aminoácidos. La coagulación ocurre por clivaje en el aminoácido 45 a partir del carboxilo terminal, resultando en la liberación de un péptido C soluble, y un residuo insoluble de 170 aminoácidos. Este péptido insoluble de 170 residuos se denomina coagulina, y es el responsable de la polimerización para formar un coágulo estable. El mecanismo por el cual el coagulígeno es clivado por la enzima procoagulante se cree que es similar al de la tripsina, una hidrolasa de serina, o al de la activación de protrombina para formar trombina. (2)

#### 2.2.13.2. Bioquímica LAL- Endotoxina:

Reacción de Coagulación En presencia de endotoxinas, el reactivo LAL produce una cascada de reacciones enzimáticas conocida como la Vía del Factor C que se compone de tres zimógenos serina proteasas intracelulares: Factor C, Factor B y una enzima pro-coagulante que actúan sobre el coagulígeno (proteína coagulable de los invertebrados similar al fibrinógeno) El factor C es un biosensor que detecta las endotoxinas iniciando la cascada de reacciones con su activación autocatalítica, al contacto con endotoxinas, el factor C se activa; este hidroliza y activa al factor B. El factor B activa a la enzima pro-coagulante (enzima de coagulación inactiva), la cual en

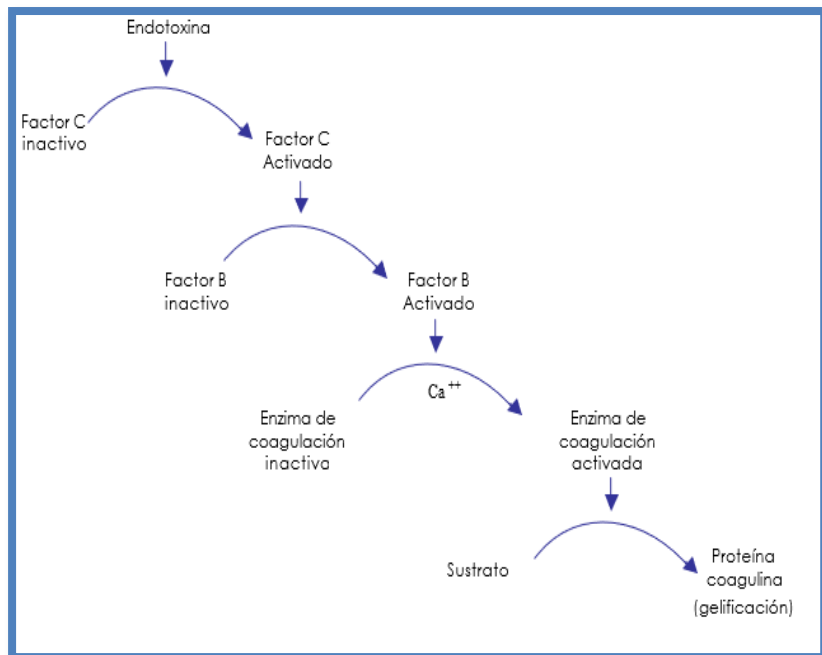
presencia de cationes divalentes ( $\text{Ca}^{++}$  /  $\text{Mg}^{++}$ ) (18) se convierte en la enzima coagulante (enzima de coagulación activada). La enzima coagulante se une al sitio específico del coagulógeno (sustrato) y produce un gel de coagulina. (Ver figuras N°5 y N°6). La pared celular de hongos y levaduras contienen diversos polímeros que incluyen celulosa, quitina, mananos y (1,3) beta glucanos. Se conoce que existe otra reacción de coagulación conocida como la Vía de Factor G, por la cual los (1,3) beta glucanos de la superficie de algunos hongos activan el factor G que convierte la enzima procoagulante en enzima coagulante y actúa sobre el coagulógeno produciendo coagulina.

Figura N°5: Representación de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de endotoxinas



Modelo Lenin 1979. Tomado de "LAL Methods and applications", Associates of Cape Cod Inc, 1999.

Figura N°6: Representación de la cascada de reacciones que experimenta el reactivo LAL en presencia de endotoxinas.



Fuente: Modelo Nakamura 1983 Tomado de "LAL Methods and applications", Associates of Cape Cod Inc, 1999.

### 2.2.13.3. Métodos del LAL

Existen 3 variaciones básicas del ensayo del LAL en el mercado: método de gelificación o gel-clot, turbidimétricos y cromogénicos. Cada fabricante de reactivos describe su propia metodología, pero en general la diferencia entre los protocolos es pequeña. La correlación entre los métodos se basa en comparar la menor dilución de un producto dado a la cual se elimina la interferencia.

LAL significa Limulus ameobocyte lysate que describe al reactivo: Limulus es el nombre científico del cangrejo de la herradura, ameobocyte (ameobocito) es la célula sanguínea que contiene la sustancia que produce coagulación y lysate (lisado) describe el proceso de lisis al que es sometida dicha célula sanguínea para la obtención del reactivo. Para la elaboración del reactivo LAL, los cangrejos son colectados del mar y transportados al laboratorio donde son desangrados por punción en el corazón con una aguja larga; la sangre o hemolinfa conteniendo los ameobocitos se colecta por gravedad en una botella de centrifuga. Puede colectarse el 30% de su sangre sin afectar al animal que es luego devuelto al mar. (7) En general, existe una correlación moderada entre los métodos cuando el reactivo LAL es producido por el mismo fabricante e incluso mejor si es del mismo lote, mientras que puede ser muy diferente hasta para el mismo método cuando el reactivo se produce por distintos fabricantes. Es por esto que uno de los aspectos críticos es la validación del ensayo, con lo cual se garantiza independientemente del método o lote que a una dilución determinada del producto no existan interferencias y por lo tanto, sea confiable la cuantificación de endotoxinas en dicha muestra. Aún subsisten confusiones con respecto a la validación del método, hay que puntualizar que lo que se valida es la muestra o su dilución, no se trata, por ejemplo, de realizar ensayos de linealidad, exactitud o precisión como se describe para la mayoría de los métodos analíticos. La validación del LAL se presenta en detalle

en la guía de la FDA, la cual se toma de referencia para el desarrollo de la presente.

Método de gelificación o gel-clot. El método de gel-clot es el ensayo clásico y el más elemental entre los métodos del LAL. La reacción desarrollada en el tubo de ensayo es esencialmente la misma que ocurre in vivo en la hemolinfa del cangrejo herradura frente a las endotoxinas. Es el ensayo menos susceptible a inhibición y requiere de un equipamiento más sencillo y menos costoso. La presencia de endotoxinas es determinada por la formación de un gel o coágulo insoluble. Se puede desarrollar de forma cuantitativa o semicuantitativa (ensayo límite). Produce resultados binarios, positivo (+) o negativo (-). Un tubo es positivo cuando el gel permanece intacto después de que se invierte cuidadosamente un ángulo de 180 °, cualquier otra condición es interpretada como negativa. El alcance del método está limitado únicamente por la sensibilidad del lisado. El mercado oferta reactivos para gel-clot con sensibilidades de 0,03; 0,06 y 0,12 UE/mL (unidades de endotóxicas por mililitro). Con este método no se podrán cuantificar endotoxinas por debajo del nivel (sensibilidad) al cual se forma un gel sólido. (16)



#### 2.2.13.4 Interferencias en el ensayo LAL

La reacción LAL se ve interferida frecuentemente por la muestra que está siendo ensayada y puede ser causada por diferentes factores.

Hay tres clases de interferencias:

Inhibición: es el tipo de interferencia más común y se reconoce por una disminución de la sensibilidad del LAL.

Todo producto debe ser ensayado previamente para verificar la ausencia de inhibición, ya que esta puede llevar a resultados falsos positivos.

La inhibición se presenta cuando las muestras a ensayar interfieren con la reacción de LAL. La interferencia puede ser causada por varios factores:

El pH de la dilución debe estar entre 6 y 8, y el del LAL debe estar entre 5.5 y 8.5. aunque el reactivo del LAL posee cierta capacidad bufferizante, la mezcla del producto-reactivo puede resultar crítico. Según Werner (1998) y Cooper (1998).

Las proteínas que tengan la capacidad de unirse a la endotoxina. Las proteasas pueden desnaturalizar las proteínas de la cascada enzimática. El calentamiento puede desnaturalizar las proteínas por lo que si este es adecuado puede permitir que las endotoxinas sean detectadas.

Los agentes Quelantes que desnaturalizan las proteínas como alcoholes y fenoles, los cuales pueden ser eliminados por evaporación o calentamiento adecuado. Estos no deben ser eliminados a sequedad

porque pueden afectar a las endotoxinas. Los agentes Quelantes como EDTA enlazan los cationes divalentes causando inhibición.

Las sustancias inmiscibles con el reactivo LAL también puede ser otra causa de inhibición. Los cationes divalentes pueden causar inhibición, pues neutralizar carga negativa de endotoxina, incrementan agregación disminuyendo actividad potencia. Sal excesiva puede inhibir la reacción. Los tubos con restos de NaOH causan interferencia y como resultado una inhibición en la formación del gel. Según Prior (1990).

### **2.3 DEFINICIÓN DE TERMINOS BASICOS**

- AGUA APIROGENADA: agua altamente purificada, ausente de endotoxinas detectable en la técnica del LAL.
- CONTROL DE ENDOTOXINA ESTANDAR (CSE): Endotoxina purificada de E. coli la cual es estandarizada contra una endotoxina estándar de referencia (RSE) el CSE es suministrado por el proveedor del LAL.
- DROGA PARENTERAL: Se refiere a drogas que son dadas intravenosamente, las drogas parenterales son clasificadas en grandes volúmenes o pequeños volúmenes, dependiendo en cuanto se le suministra al paciente, en una hora. Todas las drogas requieren testng de endotoxina.
- ENDOTOXINA: Molécula toxica derivada de la membrana celular exterior de las bacterias gram negativas. La endotoxina es una molécula compleja de polisacárido, lípido A y otros componentes de la pared celular. Es llamada pirógeno debido a que induce fiebre.

- ENDOTOXINA ESTANDAR DE REFERENCIA: es la endotoxina estándar de referencia de la farmacopea de los Estados Unidos USP, es también conocida como EC-6. Es un liofilizado de una endotoxina derivada de E. Coli que es mantenida por la USP.
- FALSOS NEGATIVOS: ocurre cuando la reacción de endotoxinas y LAL es inhibida por diversos factores como pH, cationes divalentes, agentes quelantes y residuos de NaOH en el material de vidrio.
- FALSOS POSITIVOS: ocurre cuando el LAL reacciona con una sustancia que no es endotoxina. Ej.: Glucanos.
- FDA: Administración de vigilancia de drogas y alimentos de los estados unidos, que regula los productos del LAL y los estudia a través del centro para la evaluación biológica e investigación.
- INHIBICIÓN: Condición donde la muestra en el test LAL disminuye la sensibilidad al LAL de controles de interferencia.
- INTERFERENCIA: algún tipo de desencadenamiento químico o físico o condición de inhibición, el cual altera la recuperación de endotoxina en una muestra. La inhibición.
- LAMBDA ( $\Lambda$ ): Símbolo para la sensibilidad del LAL dado en UE/ml, para el ensayo del gel-clot.
- LÍMITE DE ENDOTOXINAS: es el máximo aumento de endotoxinas permitido en un producto parenteral o aparato médico. Los límites son específicos para cada producto. El límite de endotoxina dado por la FDA para fármacos es de 5UE/Kg/hr o 0.2 UE/Kg/hr para productos intratecales, el límite para aparatos es de 0.5 UE/ml.
- LISADO DE AMEBOCITO LIMULUS: Extracto acuoso de células sanguíneas circulantes (amebocitos) del cangrejo de herradura, *Limulus Polyphemus*.
- LIPOPOLISACARIDO (LPS): Endotoxina bacteriana purificada, libre de proteína.

- MÁXIMA DILUCIÓN VALIDA (MDV): Calculo usado para determinar cuándo producto parenteral o materia prima puede ser diluido y aun detectar el límite de endotoxina.
- MÍNIMA CONCENTRACIÓN VALIDA (MCV): Es la más baja concentración de fármaco específica que puede permitir la detección del límite de endotoxina.
- SPIKE: muestra a la cual se le ha condicionado una concentración de endotoxina, con título conocido, con el propósito de verificar si hay interferencia por parte de la muestra a la endotoxina, con una serie de diluciones, usando la técnica del LAL gel-clot.
- UNSPIKE: muestra a la cual se le realizan diluciones en agua apirógena, con el propósito de verificar si existe algún tipo de inhibidor o sustancia potenciadora que reacciones con el reactivo LAL.

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 Tipo de Investigación:**

Básica

##### **3.1.1 Nivel de Investigación**

Descriptivo:

Utiliza la lógica o razonamiento deductivo, comienza con la teoría y se derivan expresiones lógicas (hipótesis) que el investigador busca someter a prueba.

##### **3.1.2 Método de la Investigación**

Inductivo:

Porque el proceso de investigación va desde de lo específico del ensayo aplicado a un lote de ampollas de furosemida hacia lo general como característica de toda la población. El método empleado es inductivo.

Campo:

En el presente estudio se saldrá a recolectará la muestra en el hospital Guillermo Almenara Irigoyen.

##### **3.1.3 Diseño de la Investigación**

Experimental:

Porque la presente investigación lleva su proceso con manipulación de la variable ya que puede manipular de manera intencional.

## 3.2 Población y Muestreo de la Investigación

### 3.2.1 Población:

#### 3.2.1.1 Delimitación cualitativa de la población:

La población de la investigación está constituida por todas las furosemida 20mg inyectable que se expenden en la farmacia del hospital Guillermo Almenara Irigoyen

#### 3.2.1.2 Delimitación cuantitativa de la población:

El tamaño de la muestra seleccionada está determinado por el número de lote de furosemida 20mg inyectable seleccionada.

### 3.2.2 Muestra:

Se recolectaron 40 furosemida 20mg inyectable del lote 75HK1967 de laboratorio Sanderson.

#### 3.2.2.1 Criterios de inclusión.

- Denominación comercial furosemida 20mg/2ml
- Presentación ampolla de furosemida 20mg/2ml
- Fabricación por laboratorio Sanderson
- Pertenece al lote 75HK1967

#### 3.2.2.2 Criterios de exclusión.

- Que no presente denominación comercial furosemida 20mg/2ml.
- Que no tenga la presentación en ampolla.
- Que no sea fabricado por laboratorio Sanderson.
- Que no pertenezca al lote 75HK1967.

### 3.3 Variables e Indicadores

VARIABLE:

VARIABLE	INDICADORES
Cuantificación de endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg inyectable	Visualización de la coagulación
	Parámetros USP 38
	Máxima dilución

### 3.4 Procedimiento, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

#### 3.4.1 Procedimientos

Recolección de la muestra :

Se recolectó 40 furosemidas 20mg/2ml inyectable las cuales se utilizaron para la cuantificación de endotoxinas.

El vial del LAL tiene 5000 UE/ vial siendo reconstituida con 5ml obteniéndose 1000 UE/mL hasta obtener una concentración final de 2  $\lambda$ .

Tabla N°1: Sensibilidad del reactivo LAL

Tubos	Concentración del CSE (UE/mL)				Control (-)
	2 $\lambda$	$\lambda$	0,5 $\lambda$	0,25 $\lambda$	
1°	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
2°	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3°	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4°	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

Tabla N°2: Confirmación de la sensibilidad del reactivo LAL

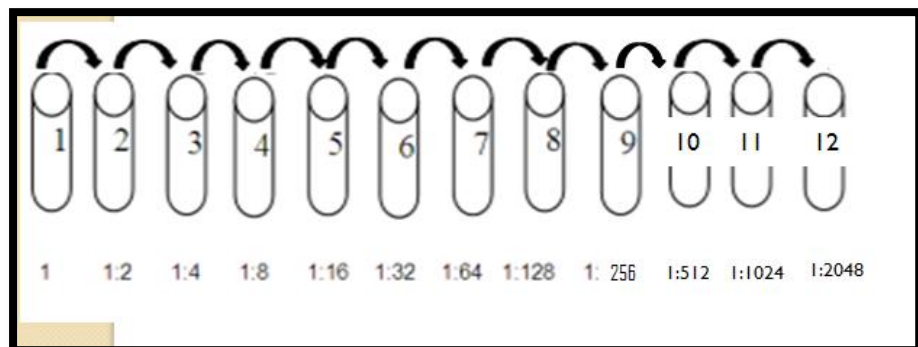
Tubo #	Endpoint UE/mL	Logaritmo Endpoint	Promedio	Antilogaritmo
1	0.03	-1.5228787	$\bar{X} = \frac{-6.091515}{4}$ = -1.5228787	Antilog-1.5228787 = 0.03
2	0.03	-1.5228787		
3	0.03	-1.5228787		
4	0.03	-1.5228787		
		$\Sigma = -6.091515$		

Luego para obtener la máxima dilución válida realizar la siguiente ecuación:

$$MDV = \frac{20 \times 3.6}{2 \times 0.03} = 1200$$

Se preparó un pool donde se diluyeron los inyectables de la muestra con el fin de obtener una muestra homogénea y representativa dentro de un beaker despirogenado se removió y se procedió a realizar las diluciones seriadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048.

Figura N°7: Diluciones seriadas



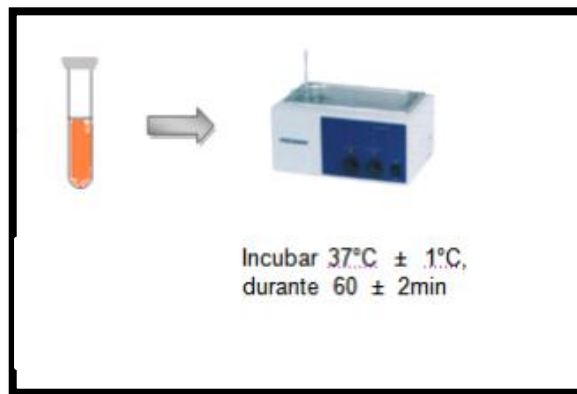
Fuente: <https://compositae.files.wordpress.com/2013/10/manualdepracticass.pdf>



### Procedimiento general de preparación de tubos

El procedimiento general para llevar a cabo el ensayo es mezclar cada una de las diluciones preparadas se le agregara (0.1 mL)del reactivo de LAL en los tubos, e incubarlos en baño de agua a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante  $60 \pm 2$ min. Una vez iniciada la incubación evitar vibraciones y mantener en reposo absoluto todos los tubos de prueba.

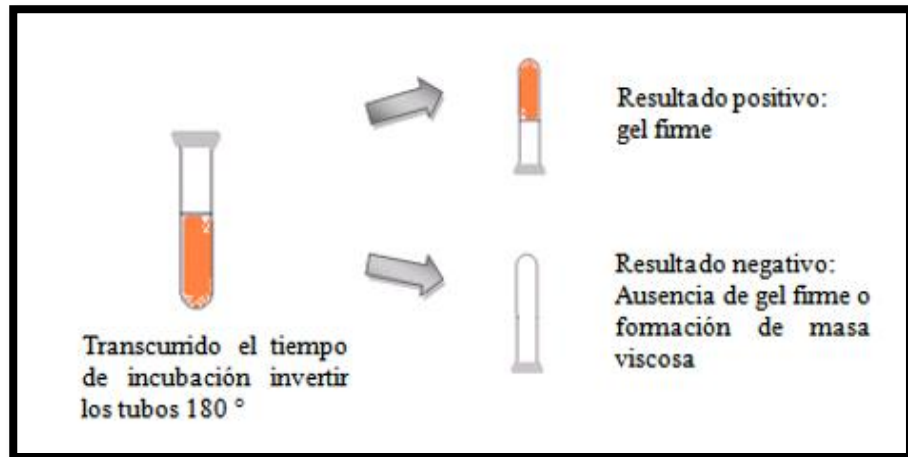
Figura N°8: Procedimiento general de preparacion de tubos.



Fuente: <http://ri.ues.edu.sv/2457/>

Interpretación de resultados Se indico la manera adecuada de realizar las lecturas de los tubos una vez transcurrido el tiempo de incubación: tomar cuidadosamente cada tubo e invertirlo lentamente hasta  $180^{\circ}\text{C}$ . Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que mantiene su integridad cuando se invierte el tubo. Un resultado negativo (-), se caracteriza por la ausencia de un gel firme o por la formación de una masa viscosa que no mantiene su integridad cuando se invierte el tubo.

Figura N°9: Esquema de interpretacion de resultados.



Fuente: <http://ri.ues.edu.sv/2457/>

Prueba de límite de coagulación de la muestra Se indicó preparar las siguientes soluciones por duplicado, tal cual lo indica la metodología de la USP 38

### 3.4.2 Técnicas

Medición cuantitativa y cualitativa de los indicadores, (muestreo de población), mediante ensayos de lisado de amebocito *Limulus* por el método de gelificación.

#### La técnica de lisado de amebocito *Limulus*:

Es una prueba para determinar la concentración de endotoxinas bacterianas que pueden estar presentes en la muestra. Se basa en la propiedad que tiene la endotoxina de inducir la coagulación de lisado de amebocitos del *Limulus Polyphemus* o “cangrejo herradura”.

#### Método de Gelificación:

Es el método permite determinar presencia y concentración de endotoxinas en formas farmacéuticas parenterales, productos biológicos, material médico, uso de inyectable. Además de ofrecer como ventaja su rapidez, especificidad, facilidad de realización, requerimientos más sencillos y de menos costos por su utilización de volúmenes mínimos de reactivos y muestras, además de ofrecer resultados confiables en corto tiempo, con menor susceptibilidad a la inhibición y alta sensibilidad para la detección de endotoxinas bacterianas.

#### **3.4.3 Instrumentos**

Hoja de resultados

## CAPÍTULO IV

### PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**Tabla N°3 PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS**

PRODUCTO FARMACEUTICO	FUROSEMIDA 20mg/ 2ml
LOTE	75HK1967
ORDEN DE TRABAJO	00203553
CÓDIGO DE MUESTRA	160032001
CANTIDAD DE MUESTRA	40 AMPOLLAS
PRESENTACIÓN	AMPOLLAS
FECHA DE EXP.	10/2017
FECHA DE ANÁLISIS	14/01/2016
HORA DE ANÁLISIS	17:15 H
MÉTODO	USP 38 (PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS – TÉCNICA DE COAGULACIÓN

**TABLA N°4 CÁLCULO DE LA MÁXIMA DILUCIÓN VALIDA**

<b>CALCULO DE MDV (máxima dilución válida)</b>		
<b>Concentración del producto</b>	<b>Límite de endotoxinas</b>	<b>Sensibilidad del reactivo LAL</b>
Furosemida 20mg/2ml	< 3.6	0.03

**Calculo a partir de la ecuación general:**

$$\text{MDV} = \frac{(\text{PRODUCTO}) \times \text{LÍMITE DE ENDOTOXINAS}}{\text{VOLUMEN} \times \text{SENSIBILIDAD DEL REACTIVO LAL}}$$

**Solución:**

$$\text{MDV} = \frac{20 \times 3.6}{2 \times 0.03} = 1200$$

<b>MDV</b>	<b>1, 200. 00</b>
------------	-------------------

Se realiza el cálculo de la MDV para furosemida inyectable el cual se toma los valores de concentración del producto por el límite de endotoxinas que está declarado en USP 38 sobre la sensibilidad del reactivo LAL, que se encuentra declarada en la etiqueta del reactivo. La máxima dilución válida es la dilución máxima permitida de una muestra a la que se le puede determinar el límite de endotoxinas.

**TABLA N°5 PRUEBA LÍMITE DE COAGULACIÓN**

<b>PRUEBA LIMITE DE COAGULACION</b>					
<b>REPLICAS</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
	<b>Muestra</b>	<b>Muestra / 2 λ de CSE</b>	<b>2 λ de CSE / agua LAL</b>	<b>LAL agua</b>	<b>Material</b>
<b>1</b>	<b>(-)</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>
<b>2</b>	<b>(-)</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>	<b>(-)</b>	<b>(-)</b>

<b>RESULTADOS</b>	
<b>Cantidad de endotoxinas</b>	<b>Unidades</b>
<b>&lt; 3.6</b>	<b>Unidades USP endotoxinas / mg de furosemida</b>

**A: muestra directa**

**B: muestra directa más endotoxinas a una concentración de 2 λ**

**C: agua LAL más endotoxina**

**D: agua del reactivo LAL**

Las soluciones B y C de control positivo contienen la preparación de endotoxinas estándar a una concentración que corresponde al doble de la sensibilidad declarada en la etiqueta del reactivo LAL.L a solución D de control negativo es agua de reactivo LAL.

**TABLA N°6 DILUCIÓN DE TRABAJO**

ITEM	DILUCIONES DE TRABAJO										
	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
MUESTRA	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CONTROL POSITIVO	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Control (+): indica presencia de endotoxinas

Control (-): indica ausencia de endotoxinas

Muestra: Es la muestra diluida más endotoxinas

Control Positivo: Es la muestra más endotoxinas a 2 λ

La MDV es 1200 esto quiere decir que se puede utilizar hasta una dilución de 1:1200 por factor de dilución 1:2.

Se ve que en la dilución 1/8 hay presencia de endotoxinas que puede ser medida.

## DISCUSIÓN

- ✓ En el trabajo de tesis “Validación de la prueba de endotoxina bacteriana (LAL) por el método gel – clot utilizando el producto furosemida (20 mg) inyectable” de la bachiller Claudia Beatriz Osorio Colindres - 2011

Se observa que se trabajó con un reactivo de menor sensibilidad (0.125), lo que conllevó a una MDV: 1:512, por lo consiguiente en este trabajo de investigación se trabajó con un reactivo de sensibilidad (0.03UE/ml) dándonos una MDV: 1:1200 lo que permite eliminar con mejor resultado las posibles interferentes.

- ✓ En el artículo “Estudio de validación del método de endotoxinas en medicamentos de 15 dipirona y clindamicina-control y análisis microbiológico de materias primas” de Pacerizu docente de biología y química,-2012, también se siguieron los lineamientos según USP.

Como se hace mención en este artículo la reacción LAL se ve interferida frecuentemente por la muestra que está siendo ensayada y puede ser causada por diferentes factores inhibidores como el pH de la muestra, los alcoholes, sustancias inmiscibles con el reactivo LAL, cationes divalentes y agentes quelantes que están asociados a los productos.

La inhibición es el tipo de interferencia más común y se reconoce por una disminución de la sensibilidad del LAL.

Por lo tanto en este trabajo de investigación no se consideró el pH como factor de inhibición para la cuantificación de endotoxinas ya que para el inyectable de furosemida 20mg se obtuvo un pH de 7.12 que se encuentra en el rango establecido para este tipo de pruebas (6.0-8.0) según USP38.



- ✓ En el artículo “Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de Limulus” de MSc. Nancy Burguet Lago, I MSc. María Isabel Reyes Tur, I MSc. Lázaro C. Brito Godoy, II MSc. Yenilen Troche Concepción-2007. Como hace mención este artículo el ajuste del pH es fundamental como parte del ensayo ya que los valores obtenidos se encuentran en el rango de (1.8-2.0) al estar por debajo de lo establecido (6-8), ocasionan interferencia con los resultados al afectar la formación del coágulo, por lo contrario en este trabajo de investigación no fue necesario un ajuste de pH ya que este se encuentra dentro del rango establecido según USP 38, por lo cual no se considera que el pH de la muestra (furosemida 20mg) ocasione interferencia con los resultados y formación del coágulo.
  
- ✓ En el artículo “Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido Zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de Limulus” de MSc. Nancy Burguet Lago, I MSc. María Isabel Reyes Tur, I MSc. Lázaro C. Brito Godoy, II MSc. Yenilen Troche Concepción-2007. Como hace mención este artículo en cuanto a sus diluciones en que la muestra está marcada con endotoxinas, el producto evidencia una inhibición total del reacción hasta la dilución 1/16; a partir de 1/32 hasta la MDV 1/112 muestra resultados positivos, lo que indica que no presenta ninguna inhibición ni interferencia que afecte la prueba LAL, a diferencia este trabajo de investigación presenta una interferencia o inhibición hasta la dilución 1/4; a partir de 1/8 hasta la MDV 1/1200 muestra resultados positivos, lo cual nos permite deducir que a mayor dilución de la muestra, menor serán las interferencias e inhibición en la muestra.

- ✓ En el trabajo de tesis “Desarrollo y validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (límulus amebocyte lysate) por el método gel-clot en la solución inyectable de hialuronato de sodio Aluronic blispack de gisberg Ecuador S.A” realizada por: Llanga Huaraca, Kristian Anibal (2014)-Ecuador. Como se hace mención en este trabajo de tesis tanto para el producto puro como para sus diluciones seriadas no presenta inhibición ni interferencia que afecte la prueba debido a que se presentan resultados positivos en todos los casos hasta la MVD. A diferencia este trabajo de tesis el producto puro no presenta interferencias que afecte los resultados, pero sus diluciones con reactivo LAL a  $2 \lambda$ , si presentaron interferencias e inhibición por lo tanto afectaron los resultados ya que estos fueron negativos hasta la dilución 1/4, presentando positivo a partir de la dilución 1/8.
  
- ✓ Según con lo especificado en USP 38 para la prueba límite de coagulación las soluciones B y C son positivas por duplicado y la solución D debe ser negativa también por duplicado. Cuando se obtiene un resultado negativo para ambas determinaciones repetidas de la Solución A y su media geométrica se debe encontrar en los rangos de  $0.5 \lambda$  y  $2 \lambda$  por los que cumple con esta regla la preparación en análisis cumple con la prueba.

## CONCLUSIONES

- ✓ Presento coagulación a partir de la dilución 1/8 hasta la dilución 1/1200 donde se pudo hallar presencia de endotoxinas.
- ✓ Se halló la cantidad de endotoxinas en furosemida 20mg/2ml inyectable el cual es 0,24 UE/mg, lo cual indica que el inyectable está por debajo de 3,6 UE/mg que es el rango establecido según USP 38.
- ✓ Se determinó la máxima dilución válida (MDV) para furosemida 20mg/2ml inyectable es 1200 por ello se tomó como máxima dilución válida hasta la dilución 1/1024.
- ✓ Se confirmó que el método de gelificación empleado para detectar la concentración de endotoxinas es eficaz, confiable, rápido y de fácil ejecución e interpretación y además no se requieren de equipos muy costosos.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Verificar el pH de la muestra que debe estar en el rango / 6-8 /.
- ✓ Al reconstituir el reactivo LAL no agitar, más bien se recomienda dejar en reposo por 10 minutos hasta que todo el liofilizado se disuelva solo.
- ✓ Encender el baño maria por lo menos a la mitad del trabajo para tenerlo listo y regulado a la temperatura deseada.
- ✓ Durante la adición de las soluciones a los tubos introducir la punta de la micropipeta hasta aproximadamente 2cm para evitar que la solución quede en las paredes de los tubos.
- ✓ Utilizar mayor cantidad de ampollas para un mejor análisis de un lote específico.
- ✓ Implementar dentro de la microbiología aplicada y control de calidad de productos farmacéuticos el tema prueba de endotoxinas bacterianas por el método de gelificación,

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.-Food and Drug Administration, Guideline on Validation of the Limulus amebocyte lysate test as an end product endotoxin test for human and animal parenteral drug, biological products and medical devices. 1987
- 2.-Gonzales María Lisa. Endotoxinas y su importancia en la salud pública [en línea] (2014). [fecha de acceso 11 de noviembre de 2015].; URL disponible en <http://www.tecnologosmedicos.org/home/images/pdf/lectura-endotoxinas-su-importancia-sal.pdf>
- 3.-Rolando Perdomo Morales. Ensayo del lisado de amebocitos del Limulus (LAL), Rev. Cubana Farm (Cuba) [en línea].2004 [fecha de acceso 11 de noviembre de 2015]. 38(1); 1-9. URL disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152004000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000100008)
- 4.-Burguet, Nancy; Brito, Lázaro César. Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica. Vaccimonitor, Rev. Cubana Farm (Cuba) [en línea].2012 [fecha de acceso 11 de noviembre de 2015], vol. 21, no 3, p. 32-36. Disponible en:[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025028X2012000300006&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1025028X2012000300006&script=sci_arttext)
- 5.-US Pharmacopeal Convention XXXVIII, Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional, 2015, p. 93-97.
- 6.-Pyrostar. Aplicaciones del ensayo de LAL en la industria farmacéutica [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.wakopyrostar.com/blog-es/post/aplicaciones-del-ensayo-de-lal-en-la-industria-farmaceutica/>  
Consultado: 10 de noviembre de 2015
- 7.- MSc. Nancy Burguet Lago, MSc. María Isabel Reyes Tur, MSc. Lázaro C. Brito Godoy, MSc. Yenilen Troche Concepción. Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del amebocito de Limulus Revista Cubana de Farmacia.

[en línea] 2012 mayo 23 [fecha de acceso 2 de noviembre de 2015]; 46(3).URL disponible en:

[http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol46\\_3\\_12/far05312.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol46_3_12/far05312.htm).

**8.-** Celina Silva Ostronoff, Felipe Rebelo Lourenço. Measurement uncertainty of chromogenic lal assays - reaction time and proportion of endotoxin and LAL reagent affects release of p-nitroaniline, São Paulo-Facultad de Ciências Farmacêuticas. [Sitio en internet]. Disponible en:<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=940&numeroEdicao=22>

Consultado: 10 de noviembre de 2015

**9.-**RIVERA ZUMAQUE, Pablo C.“Estudio validación del método de endotoxinas en medicamentos de dipirona y clindamicina-control y análisis microbiológico de materias primas. [Sitio en internet].Disponible en:<http://es.slideshare.net/pacerizu/pacerizu-investigacionesvalidacin-del-mtodo-analtico-de-endotoxinas-en-dipirona-y-clindamicina>.Consultado:8 de noviembre del 2015.

**10.-**Castro Loa, Fernando Adrian.Determinacion de endotoxinas bacterianas por el método de gelificación con lisado de amebocito de Limulus Polyphemus (LAL).[Sitio de internet].<http://es.slideshare.net/AdrianCLoa/limulus-amebocyte-lysate-endotoxin-test?related=1>. Consultado:1de noviembre 2015.

**11.-** Solís Asencios, Jenny Susan. “Validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (Limulus amebocyte lysate) por el Método de Gel Clot en Clindamicina 600 mg”. Inyectable. 2004.

**12.-** Ronald N. Bezofzky; Karen Zink McCullough. Applications of LAL IN pharmaceuticals and medical devices, immunology of insects and other arthropods, USA: Walkersville; 1990, Pag 431-433.

**13.-** Carrillo, C., Ospina, J., Aldana, D., Arias, J. D. C., & Echeverri, C. Valoración de endotoxinas bacterianas en ranitidina y penicilina G sódica

inyectable mediante la prueba de Lisado del Amebocito de Limulus. Universitas Scientiarum, 2006. 11(1), 15-28.

**14.-** Osorio Rojas, O., Pérez Mancilla, X. C., Arias Palacios, J., Rodríguez Vargas, M., & Fernández López, C. M. Interferencias en la validación del ensayo de lisado de amebocitos de Limulus para oxitetraciclina 50 mg/mL. RevCub de Farmacia, 41(1) (2007).

**15.-** Koga Roberto, Otero Manuel, Caballero José. Pruebas biológicas del anticuerpo monoclonal IOR-CEA marcado con 131I, por el método de la cloramina t, para el diagnóstico precoz de enfermedades relacionadas con el adenocarcinoma embrionario. Lima –Perú pag.146-148

**16.-** Sucup Moran Cecilia Nicté . Activación De Un Sistema De Filtrado Para La Purificación de Agua utilizada en la elaboración de soluciones Parenterales masivas e implementación de un control para su mantenimiento. [Tesis Licenciatura] Universidad De San Carlos De Guatemala, Facultad de Ingeniería, Guatemala 2009.

**17.-** Natalia Caro C., Yehimy C. Méndez. "Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración por membrana y endotoxinas bacterianas por el método de LAL en 3 productos farmacéuticos". [Tesis Doctoral] Pontificia Universidad javeriana, Bogotá D.C: Facultad de Ciencias Microbiología Industrial; 2006.

**18.-** Claudia B. Osorio Colindres. Validación de la prueba de endotoxina bacteriana (LAL) por el método gel – clot utilizando el producto furosemida (20 mg) inyectable. [Tesis de Licenciatura]. San Salvador: Facultad de Química y Farmacia; Universidad del Salvador; 2011

**19.-** Agustín, González Sánchez, and Gutiérrez Silva Enrique. Validación de la prueba de lisado de amebocito de Limulus (LAL) para la detección de endotoxinas bacterianas en soluciones parenterales. [Tesis Licenciatura] Universidad de Guadalajara, Centro universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; Zaponan 1994.

**20.-** Zuzuarregui Olasagasti, Ana. "Desarrollo de un sistema de detección de endotoxinas basado en la optimización e implementación de un protocolo de biofuncionalización sobre un biosensor electroquímico de diseño específico." [Tesis Doctoral].Donostia- San Sebastian ,2013

**21.-**US Pharmacopeal Convention XXXVIII, Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional, 2015, p. 93-97

**22.-**Mascoli CC, Wery ME. Limulus amebocyte lysate (LAL) test for detecting pyrogens in parenteral injectable products and medical devices: Advantages to manufacturers and regulatory officials. J Parenteral Drugs Assoc. 1979;33(2):81-95.



## MATRIZ DE CONSISTENCIA

**TÍTULO:** CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN FUROSEMIDA 20mg INYECTABLE MEDIANTE LA PRUEBA DE LISADO DE AMEBOCITO DE *Limulus*

**BACHILLER:** HUAMAN BENITES, Angie Estibel

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERALES	HIPOTESIS GENERALES	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
<p>¿Cuál es la cantidad de endotoxinas bacterianas presentes en furosemida 20mg inyectable?</p> <p><b>Problemas Específicos:</b></p> <p>-¿Existe presencia de coagulación en furosemida 20mg inyectable?</p> <p>- ¿La cantidad de endotoxinas bacterianas en furosemida de 20mg cumplen parámetros USP 38?</p> <p>- ¿Cuál es la máxima dilución válida (MDV) para furosemida 20mg inyectable?</p>	<p>Determinar la cantidad de endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg inyectable mediante la prueba de lisado de <u>amebocito de <i>Limulus</i></u>.</p> <p><b>Objetivos Específicos</b></p> <p>-Determinar la presencia de coagulación en furosemida 20mg inyectable.</p> <p>-Determinar si cumple con los parámetros USP 38 para la determinación de endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg inyectable.</p> <p>-Determinar la máxima dilución válida (MDV) que se le puede realizar a las furosemidas 20mg inyectable.</p>	<p>-La cantidad de endotoxinas bacterianas de furosemida 20mg inyectable se encuentra entre los rangos /3.3 - 3.7/ mediante la prueba lisado de <u>amebocito de <i>Limulus</i></u>.</p> <p><b>Hipótesis específica</b></p> <p>-Existe presencia de coagulación.</p> <p>-La cantidad de endotoxinas bacterianas en los inyectables de furosemida 20mg sobrepasa el valor establecido USP 38.</p> <p>-La máxima dilución válida (MDV) para furosemida 20mg inyectable se encuentra entre los rangos /1.212 - 1.336/</p>	<p><b>Tipo de investigación</b></p> <p>-Básica</p> <p><b>Nivel de investigación</b></p> <p>-Descriptivo</p>	<p><b>Método de investigación:</b></p> <p>-Inductivo</p> <p>-Campo</p> <p><b>Diseño de investigación:</b></p> <p>- Experimental</p>	<p><b>Variable (v)</b></p> <p>V: Cuantificación de endotoxinas bacterianas en furosemida 20mg inyectable.</p> <p><b>Indicadores:</b></p> <p><b>I1:</b> Presencia de coagulación</p> <p><b>I2:</b> Parámetros USP 38</p> <p><b>I3:</b> Máxima dilución</p>	<p><b>Población:</b></p> <p>La población de la investigación está constituida por todas furosemida 20mg inyectable que se expenden en la farmacia del hospital Guillermo Almenara Irigoyen.</p> <p><b>Muestra</b></p> <p>Se recolectaron 40 furosemida 20mg inyectable del lote 75HK1967 de laboratorio Sanderson.</p>

## ANEXOS



Figura: Equipo de baño a maria



Figura: Baño a maria (37°C)



Figura: Micropipetas, gradillas  
y tubos esteriles



Figura: Cabina de flujo laminar



Figura: Reactivo LAL y agua  
LAL despirogenada