



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

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 GINSBERG ECUADOR S.A

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

KRISTIAN ANIBAL LLANGA HUARACA

RIOBAMBA – ECUADOR

2014

DEDICATORIA

A mi Señor y Salvador Jesucristo, quien me dio la fortaleza, sabiduría, fe, salud y esperanza para culminar con éxito mi carrera.

A mis padres y hermanos que con su gran apoyo y confianza ha sido una gran fortaleza en esta etapa de mi vida

A todos mis amigos y amigas que siempre han estado junto amén esta etapa de mi vida, sepan que aunque no realice mención específica en mi corazón está grabado su nombre, gracias por todo el apoyo, amistad y cariño que me han brindado.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi Dios que he visto su mano todopoderosa en toda mi vida, por darme la oportunidad de conocerlo y haber depositado en mí sabiduría, fe, confianza y perseverancia para poder culminar esta etapa de mi vida.

A mi familia por el gran amor, apoyo y comprensión que me han brindado sin escatimar sacrificio alguno; por sus consejos y oraciones; pero en especial a mi madre quien me ha enseñado a seguir adelante a pesar de las dificultades.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por la gran contribución en la formación Académica y Profesional.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia, donde fui formado día tras día en conocimientos y valores al fin de trabajar en servicio a la comunidad.

Al B.Q.F. Carlos Pazmiño por su invaluable colaboración como director de tesis cuya ayuda, consejos, conocimientos y opiniones fueron de gran importancia en la culminación de este proyecto.

Al B.Q.F. Diego Vinuesa por su valiosa colaboración como Miembro del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la ejecución de este trabajo

A todas y cada una de las personas que de una u otra manera estuvieron ahí, apoyándome en todo momento para la culminación con éxito de este trabajo de investigación.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “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 GINSBERG ECUADOR S.A.”, de responsabilidad del señor egresado Kristian Aníbal Llanga Huaraca, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dr.Silvio Álvarez Luna DECANO FAC. CIENCIAS	_____	_____
Dr. Francisco Portero DIRECTOR DE ESCUELA	_____	_____
B.Q.F. Carlos Pazmiño DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
B.Q.F. Diego Vinueza MIEMBRO DE TRIBUNAL	_____	_____
Ing. Eduardo Tenelanda DIRECTOR CENTRO DE DOCUMENTACIÓN (E)	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo, (Kristian Aníbal Llanga Huaraca), soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

(KRISTIAN ANIBAL LLANGA HUARACA)

RESUMEN

Se 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 Hialuronato 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.

ABSTRACT

Validation of a bacterium endotoxin test called LAL (Limulus Amebocyte lísate) was carried out by the means of gelification GEL-CLOT method by using injectable solution of Sodium hyaluronate ALURONIC Blispack. This process was made at the microbiological laboratory of quality control department of the pharmaceutical industry GINSBERG S.A in the city of Quito, province of Pichincha in order to be applied in future product analysis.

A validation protocol was performed based on official methodology of bacterium endotoxin test taken by pharmacopeia of the United States, edition 35. Preliminary and validation essays through random sampling of three batches pilots of ALURONIC Blispack, proving of optimum pH sample, verification essay of reagent LAL that was developed with analyst validation, the calculus of the maximum value of dilution, inhibition test factors, interference or enhancement, and the coagulation limit test were carried out, so it was determined that sample does not have more than 0,25 units of bacterium endotoxins per ml of Sodium hyaluronate.

Based on the result obtained it is concluded that product is bacterium endotoxin free and fit for administration in patients that need it, so the methodology mentioned before is validated.

It is recommended the application of this process in future product analysis in the pharmaceutical industry and possible revalidations of it.

INDICES

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
INDICE DE FOTOGRAFÍAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	

INDICE GENERAL

CAPÍTULO I	1
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 VALIDACIÓN	1
1.1.1 OBJETIVO	1
1.1.2 RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.	1
1.1.3 TIPOS DE VALIDACIÓN	2
1.1.3.1 Validación prospectiva.	2
1.1.3.2 Validación retrospectiva.	2
1.1.3.3 Validación concurrente.	2
1.1.3.4 Revalidación.	2
1.1.4 CATEGORÍAS DE LA VALIDACIÓN	3
1.1.4.1 Categoría I	3
1.1.4.2 Categoría II	3
1.1.4.3 Categoría III	3
1.1.4.4 Categoría IV	3
1.1.5 TÉRMINOS RELACIONADOS	4
1.1.5.1 Exactitud	4
1.1.5.2 Precisión	4
1.1.5.3 Especificidad	4
1.1.5.4 Límite de detección	4
1.1.5.5 Límite de cuantificación	4

1.1.5.6	Linealidad e intervalo	4
1.1.5.7	Reproducibilidad.....	5
1.1.6	VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MICROBIOLOGÍA	5
1.1.6.1	Métodos cualitativos	5
1.1.6.2	Métodos cuantitativos.....	6
1.1.6.3	Métodos Semi-cuantitativos	6
1.1.6.4	Otros métodos.....	6
1.1.7	PLAN MAESTRO DE VALIDACION.....	6
1.1.7.1	Protocolo de Validación.	7
1.1.7.2	Ejecución de la validación y apreciación de los resultados.....	8
1.1.7.3	Informe de validación.....	8
1.1.7.4	Certificado de validación.....	8
1.2	TOXINAS BACTERIANAS.....	9
1.2.1	EXOTOXINAS BACTERIANAS	9
1.2.2	ENDOTOXINA BACTERIANA - PIRÓGENOS	9
1.2.3	HISTORIA	10
1.2.4	ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS ENDOTOXINAS BACTERIANAS.....	10
1.2.4.1	Región I	11
1.2.4.2	Región II	11
1.2.4.3	Región III.....	12
1.2.5	MECANISMO DE LA FIEBRE.....	12
1.3	PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL)	13
1.3.1	REACTIVO LAL (<i>Limulus Amebocitos Lysate</i>)	14
1.3.1.1	Historia	14
1.3.1.2	Obtención del reactivo LAL	15
1.3.1.3	Reacción de coagulación.....	15
1.3.1.4	Mecanismo de acción	16
1.3.1.5	Sensibilidad del LAL.....	17
1.3.1.6	Características.....	17
1.3.2	MÉTODOS DEL ENSAYO DE LAL.....	18
1.3.2.1	Método turbidimétrico	18
1.3.2.2	Método cromogénico	18

1.3.2.3	Método GEL-CLOT	18
1.3.3	INTERFERENCIAS DE LA TÉCNICA LAL.....	19
1.3.3.1	Inhibición.....	19
1.3.3.2	Potenciación.....	20
1.3.3.3	Falsos positivos.....	20
1.4	VALIDACION DE LA PRUEBA LAL POR EL METODO DE GEL-CLOT	20
1.4.1	ESTÁNDAR PRIMARIO DE ENDOTOXINA	21
1.4.2	ESTÁNDARES SECUNDARIOS	21
1.4.3	MÁXIMA DILUCIÓN VÁLIDA (MDV).	21
1.4.3.1	Límites de endotoxina.....	22
1.4.3.2	Concentración de la muestra.....	22
1.4.3.3	Sensibilidad del LAL.....	22
1.4.4	VALIDACIÓN DEL REACTIVO Y OPERARIO.....	23
1.4.5	VALIDACIÓN DEL PRODUCTO.....	23
1.4.5.1	Ensayos preliminares	23
1.4.5.2	Ensayo de validación del producto final.....	24
1.5	INDUSTRIA FARMACÉUTICA.....	24
1.5.1	INFORMACIÓN DE LA EMPRESA.....	25
1.5.1.1	Generalidades.	25
1.5.1.2	Misión.....	26
1.5.1.3	Visión.....	26
1.5.1.4	Políticas de calidad	26
1.6	SOLUCIONES INYECTABLES.....	26
1.6.1	MANUFACTURA DE LA SOLUCION INYECTABLE DE HIALURONATO DE SODIO.	27
1.6.2	CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS INYECTABLES.	28
1.6.2.1	Análisis físico químico de las materias primas y excipientes.....	28
1.6.2.2	Análisis material envase empaque.....	28
1.6.2.3	Análisis del agua.....	28
1.6.2.4	Análisis jeringas prellenas	28
1.7	ALURONIC® Blispack.	29
1.7.1	DATOS GENERALES DEL PRODUCTO.....	29

1.7.1.1	Composición.....	29
1.7.1.2	Presentación.....	29
1.7.1.3	Vía De Administración	30
1.7.1.4	Almacenamiento	30
1.7.1.5	Elaborado por.....	30
1.7.2	JERINGA PRELENA	30
1.7.3	HYALURONATO DE SODIO	30
1.7.3.1	Propiedades Farmacológicas	31
1.7.3.2	Farmacodinamia	31
1.7.3.3	Farmacocinética.....	32
1.7.3.4	Mecanismo de acción	32
1.7.3.5	Contraindicaciones	32
1.7.3.6	Restricciones de uso durante embarazo y lactancia.....	32
1.7.3.7	Reacciones adversas.	32
1.7.3.8	Efectos secundarios.	33
1.7.3.9	Interacciones Medicamentosas	33
1.7.4	ESTÁNDAR, MONOGRAFÍA OFICIAL USP	33
1.7.5	ESPECIFICACIONES DE CALIDAD.....	33
1.7.5.1	Determinación Hialuronato de sodio x HPLC	33
CAPITULO II		34
2	PARTE EXPERIMENTAL.....	35
2.1	LUGAR DE PRUEBAS DE ENSAYO.	35
2.2	FACTORES DE ESTUDIO	35
2.2.1	MUESTREO	35
2.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS	35
2.3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.	36
2.3.2	EQUIPOS	37
2.3.2.1	Cabina de flujo laminar	37
2.3.2.2	Horno de despirogenización	38
2.3.2.3	Agitador mecánico VORTEX Touch GLAS-COL.....	38
2.3.2.4	Baño maría TERMOBLOCK	39
2.3.3	MATERIALES DE LABORATORIO.....	39

2.3.3.1	Micropipeta 100 µl	40
2.3.3.2	Micropipeta 1000 µL.....	40
2.3.3.3	Cronometro digital.....	41
2.3.3.4	Tubos despirogenados	41
2.3.3.5	Puntas Despirogenadas	42
2.3.3.6	Tiras indicadoras de pH.....	42
2.3.3.7	Gradilla	43
2.3.4	REACTIVOS.....	43
2.3.4.1	Reactivo Limulus Amebocyte Lysate (LAL)	43
2.3.4.2	Control Estándar de Endotoxinas (CSE)	44
2.3.4.3	Agua calidad LAL.	44
2.4	TÉCNICAS	45
2.4.1	MUESTREO DEL PRODUCTO.	45
2.4.1.1	Número de réplicas para los ensayos.	45
2.4.2	ENSAYOS PRELIMINARES	45
2.4.2.1	Preparación del Control Estándar de Endotoxina (CSE).....	46
2.4.2.2	Preparación del reactivo del Lisado Amebocitos Limulus (LAL).....	46
2.4.2.3	Metodología GEL-CLOT de la prueba LAL en el producto.	46
2.4.2.3.1	Calculo del máximo valor de dilución (MVD).....	46
2.4.2.4	Desarrollo del Sistemas de diluciones	47
2.4.3	DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN.....	47
2.4.3.1	Preparación de las diluciones del CSE	47
2.4.3.2	Confirmación de la sensibilidad LAL (Rotulo $\lambda = 0.25$ UE/ml)	48
2.4.3.2.1	Procedimiento.....	48
2.4.3.3	Ensayo UNSPIKE (Diluciones de producto sin adición de endotoxina bacteriana). 49	
2.4.3.4	Ensayo SPIKE (Diluciones de producto con adición de endotoxina bacteriana)	51
2.4.3.5	Selección de la dilución de trabajo	52
2.4.3.6	Validación del producto.....	52
2.4.3.7	Ensayo de rutina	54
2.4.3.8	Análisis estadístico	55
CAPÍTULO III		56
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	56

3.1	CALCULO DEL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN (MVD).....	56
3.2	PREPARACION DE LAS DILUCIONES DEL CSE	57
3.3	CONFIRMACIÓN DE LA SENSIBILIDAD LAL (ROTULO $\lambda = 0.25$ UE/ml) Y VALIDACIÓN DE OPERARIO.....	58
3.4	ENSAYO UNSPIKE.....	59
3.5	ENSAYO SPIKE.....	59
3.6	SELECCIÓN DE LA DILUCIÓN DE TRABAJO.....	60
3.7	VALIDACIÓN DEL PRODUCTO.....	60
3.7.1	PRUEBA PRELIMINAR GEL-CLOT (1er Lote)	60
3.7.2	PRUEBA PRELIMINAR GEL-CLOT (2do Lote)	61
3.7.3	PRUEBA PRELIMINAR GEL-CLOT (3er Lote)	62
3.8	ENSAYO DE RUTINA	63
CAPÍTULO IV		65
4	CONCLUSIONES.....	65
5	RECOMENDACIONES.	67
BIBLIOGRAFIA		68
ANEXOS		74

GLOSARIO

m.o	Microorganismos
CSE:	Control estándar de endotoxina
LAL:	<i>Limulus Amebocyte lysate</i>
LRW:	Agua reactivo LAL
SD:	Desviación Estándar
CLOT:	Coagulo
EU:	Unidad de endotoxinas
PF:	Punto Final
MG:	Media geométrica
CN:	Control Negativo
BPM:	Buenas Practica de manufactura
FDA:	Administración de drogas y alimentos
ISO:	Organización Internacional de Estandarización
PMV:	Plan Maestro de Validación
POE:	procedimiento operacional estándar
RSE:	estándar de referencia de endotoxina
UFC:	unidades formadores de colonias
USP:	farmacopea de los estados unidos
ENDPOINT:	punto final
Log:	log
pH:	potencial de hidrogeno
mL:	mililitro
log:	logaritmo
µl:	microlitro
λ:	Lambda
NF	National Formulary

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N. 1	Categoría de métodos analíticos para validar.....	3
TABLA N. 2	Cuadro comparativo entre endotoxinas y exotoxinas bacteriana.....	10
TABLA N. 3	Esquema indicativo en el desarrollo del ensayo de rutina.....	54
TABLA N. 4	Preparación de las concentraciones del CSE.....	57
TABLA N. 5	Resultados del procedimiento para la confirmación de la sensibilidad del rotulo.....	58
TABLA N.6	Resultados del ensayo preliminar UNSPIKE del Hialuronato de sodio.....	59
TABLA N. 7	Resultados del ensayo preliminar SPIKE del Hialuronato de sodio.....	59
TABLA N. 8	Resultado de la validación del ALURONIC Blispack LOT. P1-1380.....	60
TABLA N. 9	Cálculo de la media geométrica y desviación estándar del ALURONIC Blispack LOT. P1-13801.....	61
TABLA N. 10	Resultado de la validación del ALURONIC Blispack LOT. P1-13802.....	61
TABLA N.11	Cálculo de la media geométrica y desviación estándar de ALURONIC Blispack LOT. P1-13802.....	62
TABLA N. 12	Resultado de la validación del ALURONIC Blispack LOT. P1-13803.....	62
TABLA N. 13	Cálculo de la media geométrica y desviación estándar de las muestras de ALURONIC Blispack LOT. P1-13803.....	63
TABLA N. 14	Resultados de las pruebas de rutina del producto a dilución 1:32 primer lote.....	63
TABLA N. 15	Resultados de las pruebas de rutina del producto a dilución 1:32 segundo lote.....	64
TABLA N. 16	Resultados de las pruebas de rutina del producto a dilución 1:32 tercer lote.....	64

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N. 1	Desarrollo de la documentación de un proceso de validación.....	7
CUADRO N. 2	Criterios de calidad del Hialuronato de sodio.....	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N.1	Estructura química de la pared celular de la bacteria Gramnegativa, sea precia el complejo lipopolisacárido (LPS) y sus partes: lípido A, polisacárido R y polisacárido O.”.....	11
GRÁFICO N.2	Cangrejo americano herradura (<i>Limulus polyphemus</i>)......	15
GRÁFICO N.3	Estructura química del Hialuronato de sodio.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N.1	Estructuración de las tres regiones del lipopolisacárido de la endotoxinas bacterianas.....	12
FIGURA N.2	Secuencia de la reacción pirogénica.....	13
FIGURA N.3	Esquema representativo de la reacción en cascada que presenta el reactivo LAL frente a una endotoxina	16
FIGURA N.4	Cascada de coagulación de las endotoxinas frente al reactivo LAL	17
FIGURA N.5	Parámetros de calidad para los medicamentos	24
FIGURA N.6	Esquema representativo de la producción de inyectables.....	27
FIGURA N.7	Esquema del sistema de diluciones de orden secuencial.....	47
FIGURA N.8	Esquema de preparación del ensayo preliminar UNSPIKE.....	51
FIGURA N.9	Esquema general del ensayo preliminar SPIKE.....	53
FIGURA N.10	Esquema de trabajo en el ensayo del producto.....	53

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N. 1	Presentación comercial ALURONIC Blispack solución inyectable. GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....36
FOTOGRAFÍA N. 2	Presentación jeringas prellenas de ALURONIC Blispack GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....36
FOTOGRAFÍA N. 3	Cabina de flujo laminar LABCONCO calificada. Área de microbiología. Departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....37
FOTOGRAFÍA N. 4	Horno de despirogenación MEMMERT. Área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....38
FOTOGRAFÍA N. 5	Agitador mecánico vortex área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....38
FOTOGRAFÍA N. 6	TERMOBLOCK área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....39
FOTOGRAFÍA N. 7	Micropipeta automática 100 µl área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....40
FOTOGRAFÍA N. 8	Micropipeta automática 1000 µl. área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....40
FOTOGRAFÍA N. 9	Cronometro digital. Área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....41

FOTOGRAFÍA N. 10	Tubos despirogenados ENDOSAFE. área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....41
FOTOGRAFÍA N. 11	Puntas Despirogenadas para pipetas automáticas. Área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....42
FOTOGRAFÍA N. 12	Tiras indicadoras de pH. Área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....42
FOTOGRAFÍA N. 13	Gradilla área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....43
FOTOGRAFÍA N. 14	Reactivo de <i>Limulus Amebocyte Lysate</i> . Área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....43
FOTOGRAFÍA N. 15	Reactivo control estándar de endotoxinas. Área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....44
FOTOGRAFÍA N. 16	Agua tipo LAL. Área de microbiología departamento de control de calidad GINSBERG Ecuador S.A. Quito.....44

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N.1	Reporte de análisis TOC fusión - agua grado inyectables.....	78
ANEXO N.2	Valores de conductividad y pH como función de temperatura en diferentes etapas consideradas.....	79
ANEXO N.3	Formato de análisis de prueba de endotoxinas bacterianas.....	80
ANEXO N.4	Modelo de certificado de prueba LAL.....	81
ANEXO N.5	Formato de un protocolo de validación de proceso.....	82
ANEXO N.6	Parámetros de calidad del producto comercial ALURONIC Blispack.....	85
ANEXO N.7	Identificación del producto: ALURONICK Blispack elaborado..	85
ANEXO N.8	Estándar secundario para Hialuronato de sodio.....	85
ANEXO N.9	Formación del gel por Coagulación.....	86
ANEXO N.10	Incubación de los tubos en la prueba de gelificación.....	87
ANEXO N.11	Desarrollo del ensayo LAL.....	87
ANEXO N.12	Lectura de los tubos.....	87

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica hoy en día es un sector importante a nivel mundial debido a que en ella se elaboran una gran cantidad de fármacos destinados a tratar, prevenir y curar patologías que se presentan en diferentes circunstancias, épocas, y lugares del mundo, se la ha catalogado de esta manera por la cantidad de proyectos de investigación, procesamientos y desarrollo en su línea para el bien de la humanidad buscando siempre estar a la altura de las circunstancias de poder cubrir requerimientos necesarios para alcanzar la excelencia.

Tomando en cuenta que su objetivo principales dotar medicamentos de excelente calidad, la industria farmacéutica ha desarrollado procesos de elaboración dando cumplimiento a las Buenas Prácticas de Manufactura ara ello se equipan con adecuadas tecnologías, métodos, técnicas,infraestructura y personal humano calificado desarrollando así protocolos de calidad certificados para cada uno de sus productosasegurando así la obtención de fármacos que restablezcan la salud de los pacientes y de esta forma cubren la necesaria y debida regulación con las que son monitoreadas y controladas por parte de organismos de vigilancia nacionales o internacionales como el ARCSA (Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria), OMS, OPS, FDA etc.

Todo este esfuerzo se traduce en las buenas prácticas de manufactura cuya finalidad es unificar criterios orientados a obtener la calidad del producto, verificar su excelencia paso a paso y reproducibilidad lote a lote que se ve manifestado con el surgimiento de un proceso de validación que consiste en establecer la evidencia documentada que demuestre con alto grado de confiabilidad que un análisis o proceso específico determine de forma consistente productos con características de calidad especificadas.

Para alcanzar este nivel de calidad mediante la validación, se requiere garantizar que cada una de las etapas de la producción, análisis y seguimiento se realiza de forma adecuada y cumpliendo parámetros de calidad que se han establecido previamente; de

manera que se demostrará que los procedimientos analíticos utilizados en dicho laboratorio son aptos, indicados a través de la realización de ensayos de verificación, pruebas límites, sensibilidades, factores interferenciales, etc. ya sea en el producto semielaborado o terminado en cualquiera de sus presentaciones.

La manufactura de productos parenterales se diferencian de los demás por su alto grado de pureza y por estar libres de contaminantes físicos, químicos y biológicos, ya que la presencia de cualquiera de estos puede afectar no solo la vida útil del fármaco sino también la salud del paciente, por lo que involucra una serie de operaciones y controles rigurosos orientados a obtener un producto que cumpla tales especificaciones

Son de gran importancia las pruebas que se realizan al producto final, ya que garantizan su calidad, asegurando que esté se está elaborando en condiciones adecuadas que facilitan su comercialización.

El control microbiológico en los productos parenterales es importante ya que en su administración, los mecanismos de defensa primarios no actúan y se requiere que el fármaco sea inocuo asegurando que no se ponga en riesgo al paciente por causa del medicamento. Es por esto que en la siguiente investigación se desarrollará la validación de un procedimiento estándar para la determinación de Endotoxinas bacterianas por el método de GEL - CLOT utilizando inyectables de Hialuronato de sodio ALURONIC Blispack. (25 mg) en las instalaciones del laboratorio Nacional GINSBER ECUADOR S.A., aplicando metodología analítica que provee la farmacopea de los Estados Unidos (USP) en su edición 32 ya que establece los parámetros que todo laboratorio productor de medicamentos utiliza para asegurar la calidad de sus productos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 VALIDACIÓN

La validación de métodos analíticos se ha definido como la verificación y comprobación de que un procedimiento o método analítico específico es válido para ser aplicado con un alto grado de seguridad y que es respaldado mediante documentación.¹

1.1.1 OBJETIVO

El objetivo de la validación es establecer de la forma más confiable que un método analítico es apto para ser aplicado.

1.1.2 RAZONES QUE JUSTIFICAN LA VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

- Nos permitir trabajar con una metodología confiable aplicable a distintos procedimientos sea de análisis, procedimientos, pruebas, etc.
- Durante el proceso de la validación a más que se adquiere experiencia durante el desarrollo del mismo nos permite conocer el fundamento mismo de la metodología validada.

¹AEFI 2001

- Una vez validado el método los resultados obtenidos son de mayor calidad, confianza y seguridad, minimizando así errores, fallos y repeticiones, lo que nos lleva a ahorrar tiempo y dinero.²

La validación es también un requisito previo de los procesos de transferencia, intercambio y desarrollo de métodos analíticos.

1.1.3 TIPOS DE VALIDACIÓN

1.1.3.1 Validación prospectiva.

Es aquella que se efectúa en la etapa de desarrollo del producto, antes de la distribución y comercialización del nuevo producto realizado bajo un proceso de manufactura controlada, donde los estudios pueden alterar las características del producto. Se fundamenta en el análisis de datos conseguidos del diseño y desarrollo de métodos nuevos.³

1.1.3.2 Validación retrospectiva.

Validación de un proceso para un producto ya en distribución, fundamentada en datos documentados de producción, ensayo y de control. Usa todos aquellos resultados obtenidos en los análisis y controles dentro del proceso.³

1.1.3.3 Validación concurrente.

Aplicada a pequeños cambios, revalidaciones o procesos que no han sido validados pero son empleados regularmente como técnica de análisis. También son aplicables en casos de poseer nuevos fabricantes de principios activos.⁴

1.1.3.4 Revalidación.

Este tipo de validación es aplicable parcial o totalmente al realizar cambios o suprimir partes de un método, el mismo que puede afectar su confiabilidad.

² <http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>

³ TORRES, A. 1992

⁴ http://www.ehowenespanol.com/tipos-validacion-procesos-lista_314177/

1.1.4 CATEGORÍAS DE LA VALIDACIÓN

Los métodos analíticos para su validación se clasifican en las siguientes categorías

1.1.4.1 Categoría I

Para métodos de cuantificación de un componente: activos, ingredientes o componentes específico mismo de productos terminados sea farmacéuticos, alimenticios, cosméticos, etc.

1.1.4.2 Categoría II

Encierra ensayos cuantitativos, pruebas límite y métodos de determinación de impurezas, trazas de productos terminados o a granel. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.

1.1.4.3 Categoría III

Métodos analíticos para determinación de un analito en una muestra para evaluar una característica de funcionamiento, etc.

1.1.4.4 Categoría IV

Encierra todos aquellos análisis para caracterización o identificación de un analito en una muestra, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés.⁵

TABLA 1. CATEGORIA DE METODOS ANALITICOS PARA VALIDAR. (SNYDER Y COLS. 2010)

Analytical Performance Characteristics to Measure vs. Type of Method					
Analytical Performance Parameter	Category 1: Assays	Category 2: Impurities Quantitative Limit Tests	Category 3: Specific Tests	Category 4: Identification	
Accuracy	Yes	Yes	*	*	No
Precision	Yes	Yes	No	Yes	No
Specificity	Yes	Yes	Yes	*	Yes
LOD	No	No	Yes	*	No
LLOQ	No	Yes	No	*	No
Linearity	Yes	Yes	No	*	No
Range	Yes	Yes	No	*	No
Robustness	Yes	Yes	No	Yes	No

Source: Data from [12].
Note: *May be required, depending upon type of test. For example, although dissolution testing falls into category 3, as a quantitative test, measurements typical of category 1 are used (with some exceptions).

⁵SNYDER y COLS. 2010

1.1.5 TÉRMINOS RELACIONADOS

1.1.5.1 Exactitud

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante ese método y el valor verdadero.

1.1.5.2 Precisión

Es el grado de coherencia de los resultados que arroja un proceso aplicado dos o más veces. También se determina la eficacia del analista que aplica el método, se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.⁶

1.1.5.3 Especificidad

Es la capacidad de evaluar de manera incuestionable el analito en presencia de aquellos componentes cuya presencia es previsible como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

1.1.5.4 Límite de detección

Rasgo distintivo de las pruebas de límite, es la cantidad mínima del analito en una muestra que puede detectarse.⁷

1.1.5.5 Límite de cuantificación

Propio de las valoraciones cuantitativas de compuestos presentes bajo la concentración de la matriz de una muestra, como impurezas de fármacos a granel y productos de degradación en productos farmacéuticos terminados.⁸

1.1.5.6 Linealidad e intervalo

Es la capacidad para conseguir resultados proporcionales de forma directa o por medio de una transformación matemática bien definida.⁸

⁶<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s15.htm>

⁷USP 35 – NF 30. 2012

⁸<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s15.htm>

1.1.5.7 Reproducibilidad

Capacidad de que los análisis y resultados puedan volver a analizarse en la misma muestra bajo las mismas condiciones reproducibilidad en diferentes escenarios, como por ejemplo en diferentes laboratorios, diferentes analistas, equipos, lotes, reactivos, temperatura, e incluso el tiempo.⁹

A continuación se resume las características y análisis a ser considerados al utilizar diferentes tipos de procedimientos analíticos:

1.1.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS EN MICROBIOLOGÍA

La validación de métodos de control microbiológico persigue los mismos objetivos que la validación analítica química debido a que su fundamento es el mismo, la diferencia está en los métodos utilizados debido a que se trabaja con organismos biológicos que son de mayor complejidad.¹⁰

Existen instrumentos y equipos característicos como autoclave, estufas de cultivos, sistema de filtración, equipos para identificación de microorganismos, cabinas de seguridad, así como reactivos y materiales como medios de cultivo, diluyentes, cepas control, filtros, propios del entorno microbiológico que requieren, igualmente, la aplicación de principios específicos para este tipo de validación.¹¹

En microbiología, es necesario estandarizar cuidadosamente todos los factores que intervienen en las tareas a realizar (tiempos, ciclos de esterilización, número de subcultivos de microbios, formación y cualificación del personal, etc.) ya que al trabajar con microorganismos la variabilidad es mucho mayor.¹¹

La validación de métodos microbiológicos es diferente y se pueden clasificar en:

1.1.6.1 Métodos cualitativos

Aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un microorganismo determinado, claramente especificado, en una porción de sustancia (muestra).

⁹SKOOG, D y otros. 2005

¹⁰BURGUET, N y otros. 2012

¹¹http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Lecturavalidacion-4_15038.pdf

1.1.6.2 Métodos cuantitativos.

Aquellos en los que se desea indicar el número de unidades formadoras de colonia en una cantidad de sustancia, realizando un recuento concreto, cuantificar la concentración de anticuerpos específicos, de ácidos nucleicos (por ejemplo, carga viral, etc.). Su objetivo es detectar un valor numérico de un agente infeccioso en una muestra.¹²

1.1.6.3 Métodos Semi-cuantitativos

Aquellos en los que se indica el número de microorganismos en una cantidad de muestra determinada, teniendo en cuenta la estadística, como por ejemplo el Método del NMP (Número Más Probable).¹²

1.1.6.4 Otros métodos

Algunos autores destacan como otros métodos los de identificación, que en realidad son métodos cualitativos donde lo que interesa es la positividad o negatividad de una o varias pruebas. Los métodos de estudio de sensibilidad se pueden considerar como métodos cuantitativos en base a que el resultado es numérico en el caso de la concentración mínima inhibitoria.

Igualmente se debe evaluar cuidadosamente los criterios de repetición de un ensayo cuando un primer análisis ha sido incorrecto ya que los análisis microbiológicos necesitan más tiempo que los químicos para obtener resultados. En conclusión la obtención de resultados confiables y seguros va a depender de la correcta aplicación de la metodología y todo el desarrollo del proceso.¹³

1.1.7 PLAN MAESTRO DE VALIDACION.

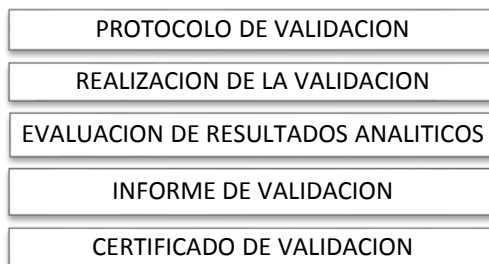
Toda validación empieza a partir de un ensayo ya probado y ajustado para poder demostrar con un número mínimo de ensayos, que tanto el método de análisis como su sistema analítico asociado producirán resultados veraces y coherentes al método aplicado. Esto siempre va con un respaldo de documentación establecida de acuerdo al siguiente esquema.¹⁴

¹²CAMARÓ, María y otros. 2013

¹³<http://www.catlab.com.ar/notas.php?idm=1408&accion1=notas&PHPSESSID=f1b21309ce96e5d4b326c93398d>

¹⁴ALDANA, D y otros. 2006

CUADRO 1. DESARROLLO DE LA DOCUMENTACIÓN DE UN PROCESO DE VALIDACIÓN



1.1.7.1 Protocolo de Validación.

Va escrito especificando el método a utilizar y que previamente ha sido revisado y aprobado por asesores calificados entendidos a profundidad del tema, especificando todas las condiciones de trabajo, etapas y criterios de aceptación.¹⁵

Incluye los siguientes puntos:

➤ **Parámetros a estudiar**

Se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.

➤ **Muestras**

Se lleva a cabo tomando en cuenta los procedimientos internos documentados internamente, se hace énfasis también a las buenas prácticas de laboratorio.

➤ **Responsables**

Son las personas que llevaran a cabo la validación y de las que las aprobaran.

➤ **Equipos**

Se han de identificar los equipos implicados en el proceso de validación (pH-metro, balanza, HPLC, etc.) y comprobar que están conveniente cualificados, referenciando estos datos en el informe de validación.

¹⁵CUESTA, A. 2010

➤ **Métodos analíticos**

Existirán métodos escritos describiendo el procedimiento para la determinación de los parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnicas y cálculos.¹⁶

1.1.7.2 Ejecución de la validación y apreciación de los resultados.

Todos los datos primarios deben ser perfectamente auditables, una vez realizada la parte experimental de la validación se evalúan los resultados obtenidos. Si por alguna situación durante la ejecución del análisis se produce algún cambio, este se especificara como un anexo con la respectiva justificación del cambio introducido.¹⁷

1.1.7.3 Informe de validación.

Incluye algunos aspectos como:

- a) El protocolo, el cual se describe todos los procedimientos que se aplicaron en la determinación de los parámetros relacionados.
- b) Toda la documentación y referencias calificadas de equipos, instrumentos y materiales.
- c) Se incluye también la discusión de los resultados y conclusiones. Indicando el resultado de aceptación de la validación del método analítico, indicando toda la información requerida para respaldar el resultado arrojado durante la finalización del proceso como limitaciones y recomendaciones.¹⁸

1.1.7.4 Certificado de validación.

El certificado de validación es un documento emitido por el laboratorio una vez que ha sido aprobado por parte del director de validaciones, en donde está contenido el protocolo de validación y el resultado final. El informe de validación debe incluir todo el protocolo como: propósito, alcance, responsabilidades, procedimiento, Datos obtenidos den la validación, análisis de datos, conclusiones, recomendaciones, anexos, etc.¹⁹

¹⁶AEFI. 2001

¹⁷RAMÍREZ, J y otros. 2010

¹⁸CASTILLO, Beatriz. 1996

¹⁹ AEFI. 2001

1.2 TOXINAS BACTERIANAS.

La palabra toxina se deriva del latín TOXICUM que significa veneno y es una sustancia específica secretada por microorganismos, en general bacterias en un organismo vivo o en medios de cultivos naturales o artificiales, se les atribuye la mayor parte de los síntomas y lesiones de enfermedades microbianas que desencadenan una respuesta inmunitaria por parte del huésped.²⁰

Existen dos tipos de toxinas:

1.2.1 EXOTOXINAS BACTERIANAS

Las exotoxinas son toxinas de origen proteico que son secretadas extracelularmente por un microorganismo como bacterias, son solubles, termolábiles y muy potentes causando daño local o general al huésped que ha tenido contacto con este, entre las más conocidas tenemos la botulínica que aunque estimula la producción de anticuerpos no producen fiebre.²¹

1.2.2 ENDOTOXINA BACTERIANA - PIRÓGENOS

Las endotoxinas llamadas también pirógenos son sustancias bacterianas que se liberan en grandes cantidades después de la multiplicación o muerte celular, están presentes en bacterias Gram negativas y se ligan a la pared externa mediante incrustaciones. Son tóxicas en grandes cantidades y pueden llegar a producir una respuesta inmunitaria en el individuo como fiebre o shock.

La palabra pirógeno se deriva de los vocablos: piro = fuego y gen = origen. Y son de gran importancia en la industria farmacéutica debido a las reacciones que provoca los organismos vivos al ser administradas en inyectables. Su actividad pirogénica es mayor que la de cualquier otra sustancia, es por ello que se ha generalizado la ausencia de endotoxinas en un inyectable.²²

²⁰ [http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content =article&id=406&Itemid=489](http://www.diversidadmicrobiana.com/index.php?option=com_content&view=article&id=406&Itemid=489)

²¹ HARLEY, J. y otros. 2009

²² USP 35 – NF 30. 2012

TABLA 2. CUADRO COMPARATIVO ENTRE ENDOTOXINAS Y EXOTOXINAS BACTERIANAS

CARACTERÍSTICAS	ENDOTOXINAS	EXOTOXINAS
Tipo bacteriano	Bacteria Gramnegativa	Mayoría de bacterias Gram positivas, Algunas Gram (-)
Ubicación celular	Lipopolisacárido de la pared celular	Citoplasma
Estructura química	Porción lipídica del lipopolisacárido	Proteínas
Estabilidad al calor	Estable	Inestable
Toxicidad	Baja	Alta
Síntomas	Inflamación, fatiga, Desórdenes, respiratorios, shock séptico.	Necrosis celular y tisular efectos neurológicos, deshidratación.
Enfermedades	Shock séptico	Botulismo, cólera, difteria.

FUETE: HARLEYJ, KLEIND. "Microbiología" Prescottt1999

1.2.3 HISTORIA

En el año de 1911 el científico Wechbelman observo reacciones pirogénicas en pacientes a los que se les había administrado Arsfenamia por vía intravenosa, presentando escalofríos y fiebre después de su administración. Una década después Sieber evidencia que la fiebre que se presentaba luego de la administración de este inyectable es originada por partículas de origen bacteriano dándole el nombre de pirógeno por el aumento de temperatura que provocaban.

Dichos experimentos llevaron a desarrollar una prueba de detección de pirógenos para inyectables en conejos, ésta prueba ha sido muy utilizada por más de 40 años mediante de la determinación de la respuesta febril, permaneciendo prácticamente invariable con una efectividad escasamente cuestionada.²³

1.2.4 ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS ENDOTOXINAS BACTERIANAS

Son complejos de lipopolisacaridos de alto peso molecular y están formando parte de la pared celular de las bacterias gran negativas patógenas o no patógenas como *Neisseria*, *Higella*, *E coli*, entre otros.²⁴

²³AGUDELO, C. 1999

²⁴WALKER, T. 1998

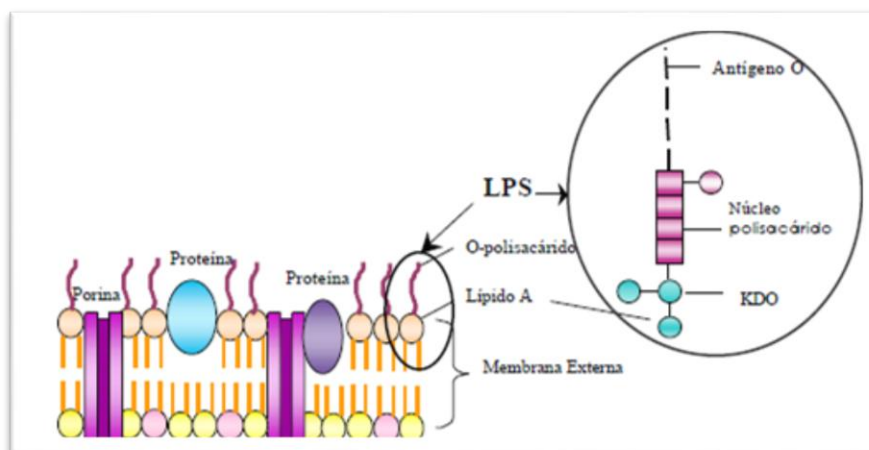


GRAFICO N° 1.“ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA PARED CELULAR DE LA BACTERIA GRAMNEGATIVA, SEA PRECIA EL COMPLEJO LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) Y SUS PARTES: LÍPIDO A, POLISACÁRIDO R Y POLISACÁRIDO O.”TOMADO DE SOLIS, J 1999 “THE GRAPES OF STAPH” MANUAL DE MICROBIOLOGIA

Están estructuradas por tres regiones principales que son:

1.2.4.1 Región I

Un componente lipídico denominado región A de naturaleza hidrofóbica compuesta por un disacárido de N-acetilglucosamina fosforilada (NAG) unidas a 7 ácidos grasos saturados. Esta región es similar en todas las bacterias gram negativas.

1.2.4.2 Región II

Consiste en una cadena corta de azúcares que está unida al N-acetilglucosamina y consta de dos partes:

Un núcleo interno en el cual se encuentran 2 partes constituyentes, dos azúcares propios de las bacterias gram negativas, el L-glicero-D-manoheptosa ácido y el 2-ceto-3-deoxioctonoico (KDO), este último de gran importancia debido a que funciona como indicador de endotoxinas.²⁵

La parte externa del núcleo está constituido por un polisacárido R, común en todas las bacterias del genero Salmonella y que está compuesta por una base hexosa como la glucosa o galactosa.²⁶

²⁵ SOLIS, Jenny. 2004

²⁶FARMACOPEA ARGENTINA. 2003

1.2.4.3 Región III

Consiste en cadenas conformadas por unidades repetidas de oligosacáridos de 3 o 4 azúcares complejos que son los encargados de unirse al polisacárido R debido a su dominio hidrofílico, esta región es mucho más grande que el núcleo polisacárido y es el principal determinante antigénico de la pared celular. ²⁷

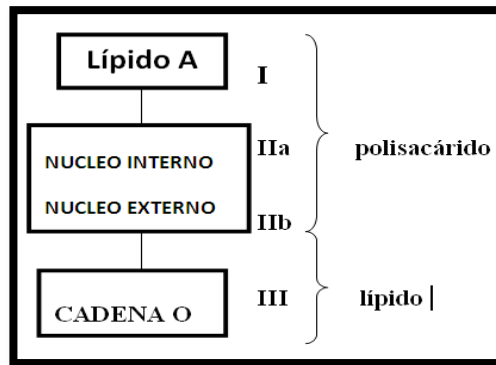


FIGURA N° 1 ESTRUCTURACIÓN DE LAS TRES REGIONES DEL LIPOPOLISACÁRIDO DE LA ENDOTOXINAS BACTERIANAS
POR: Kristian LLanga. 2014

1.2.5 MECANISMO DE LA FIEBRE.

El mecanismo de la fiebre es un evento fisiopatológico una manifestación inmediata del organismo animal, producto de una respuesta de protección frente a un pirógeno o sustancia extraña al huésped, como alguna sustancia no biológica, una infección bacteriana, fúngica, virus o productos de estos que se ha introducido a nuestro organismo y que pueden llegar a causar una enfermedad.

Estos agentes inductores estimulan la producción de pirógenos endógenos o llamados también agentes de destrucción que son proteínas de defensa llamadas citoquinas circulantes, entre ellas tenemos la interleuquina IL-1, IL-8, el factor de necrosis tumoral α y el interferón. ²⁸

²⁷PRESCOTT L, HARLEY J, KLEIN D. 1999

²⁸ÁLPIZAR, L. 1999

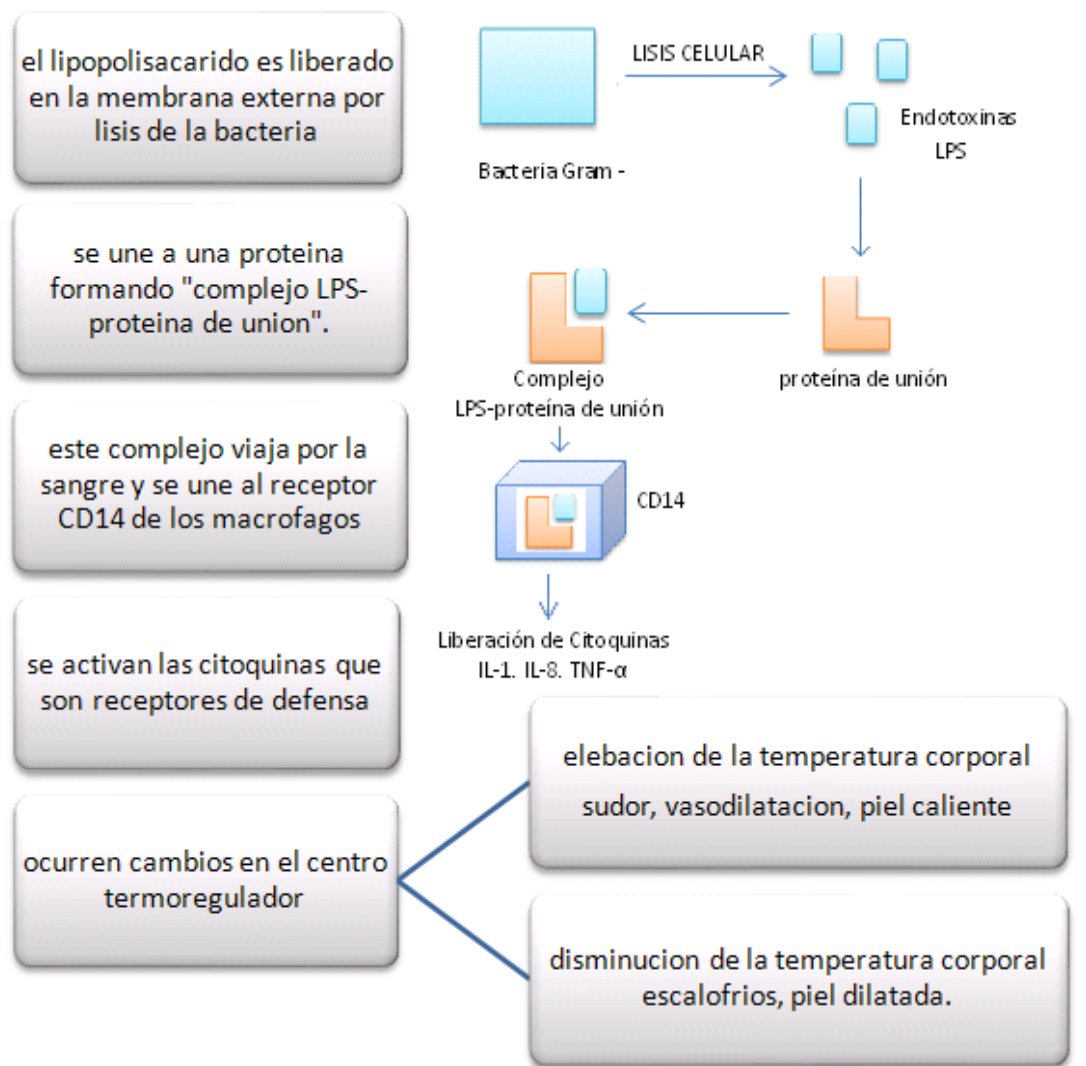


FIGURA N° 2 SECUENCIA DE LA REACCIÓN PIROGÉNICA.

1.3 PRUEBA DE ENDOTOXINA BACTERIANA (LAL)

La prueba de endotoxinas bacterianas por el método LAL en los últimos años ha venido a ser la mejor opción en cuanto a determinación de pirógenos en inyectables, debido a la eficacia en cuanto a resultados y tiempo. Es muy importante este ensayo en el control de calidad de inyectables por su repercusión en la salud humana, puesto que la presencia de endotoxinas y la 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.²⁹

²⁹USP 35, NF 30. 2012

La regulación y exigencia a las casas farmacéuticas por parte de organismos de control de productos farmacéuticos (Farmacopeas) exigen cada vez más que en sus monografías ejecuten la aplicación del método del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) para la confirmación de ausencia de pirógenos en los productos inyectables terminados.

1.3.1 REACTIVO LAL (Limulus Amebocitos *Lysate*)

El reactivo LAL es un extracto acuoso de amebocitos compuesto por una cascada de enzimas Serino proteasas de tipo tripsina capaces de reaccionar frente a mínimas cantidades de endotoxinas.

El termino LAL nace de la unión de tres palabras claves que componen este reactivo que son *Limulus* debido al nombre científico del tipo de cangrejo que se le conoce también como cangrejo herradura, el termino amebocyte hace referencia a las células sanguíneas que está conteniendo a la sustancia responsables de producir la coagulación y lístate (lisado) que hace referencia al proceso de lisis en tales células sanguíneas. Ha habido un notable desarrollo y un creciente interés en el conocimiento y dominio del ensayo del LAL que ha ganado cada vez más el interés y aceptación en la industria farmacéutica teniendo en cuenta además el que ha alcanzado el método su importancia para el cumplimiento de las Buenas Prácticas en el proceso de fabricación de inyectables.³⁰

1.3.1.1 Historia

A mediados de los años 50 el doctor Frederick B. Bang descubre la muerte del cangrejo herradura americano *Limulus polyphemus*, y que la causa de su muerte es la coagulación intravasculas, una década después y junto a Jack Levin descubren que la causa de coagulación de la hemofilia de la sangre del cangrejo es provocada por la presencia de endotoxinas bacterianas, confirmando cuatro años más tarde que los responsables de la coagulación inducida por endotoxinas son de naturaleza enzimática presentes en la parte interna de los amebocitos único tipo de células presentes en la hemolinfa azul de los cangrejos herradura.³¹

³⁰SOLIS, Jenny. 2004

³¹PERDOMO MORALES Rolando. 2004



GRAFICO N°2. CANGREJO AMERICANO HERRADURA (*Limulus polyphemus*).

El cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) y el cangrejo Japonés (*Tachyleiustridentatus*spp.), una especie de Limulidos contienen amebocitos un tipo de células sanguíneas circulantes en el sistema circulatorio o hemofilia contienen gránulos de proteína que se gelifica frente a endotoxina bacterianas en especial de la especie Gram negativo estos gránulos que son liberados muy rápidamente en un tiempo de 90 segundos contienen un factor antimicrobiano (factor anti LPS) y 4 factores de coagulación. El orden de reacción de estos gránulos se basa en enzimas con actividad de proteasas de serina en forma de zimógenos (factores C, B, una enzima procoagulante, y el coagulógeno).³²

1.3.1.2 Obtención del reactivo LAL

Para la obtención del reactivo LAL se realiza un riguroso proceso de extracción de la sangre de los cangrejos herraduras con una punción en el corazón para luego ser liberados nuevamente al mar en perfecto estado, esta sangre es tratada asépticamente extrayendo el reactivo cumpliendo estándares de calidad elevados y emitiendo un certificado de calidad, esterilidad y veracidad.³²

1.3.1.3 Reacción de coagulación.

La reacción del reactivo se basa en una reacción enzimática de cascada y que al parecer parece ser el responsable de su sensibilidad. Esta prueba ha sido muy utilizada para ensayos in vitro semicuantitativo de endotoxinas. La proteína extraída de los amebocitos lisados de *Limulus* contiene un factor de coagulación, denominando así a esta prueba:

³²CORTES, Natalia. 2006

Ensayo del LAL (Lisado de Amebocito de *Limulus*). Este ensayo persigue la detección de la gelación o coagulación de la proteína después de ser incubada con endotoxinas caracterizadas bajo condiciones específicas.³³

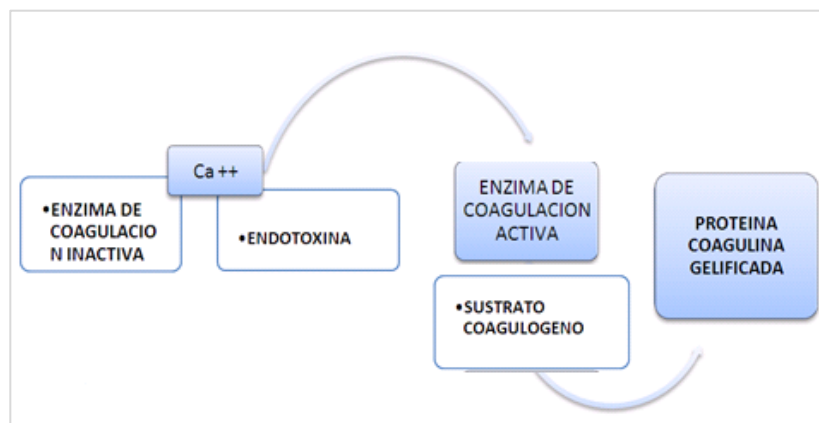


FIGURA N°3. Esquema representativo de la reacción en cascada que presenta el reactivo LAL frente a una endotoxina. ELABORADO POR: LLANGA Kristian, 2014

Esta prueba se basa en la reacción que ocurre entre la proteína de coagulación con una endotoxina formando un coagulo, la proteína es desdoblada por la enzima de coagulación activada que se unen mediante interacción iónica formando el gel.

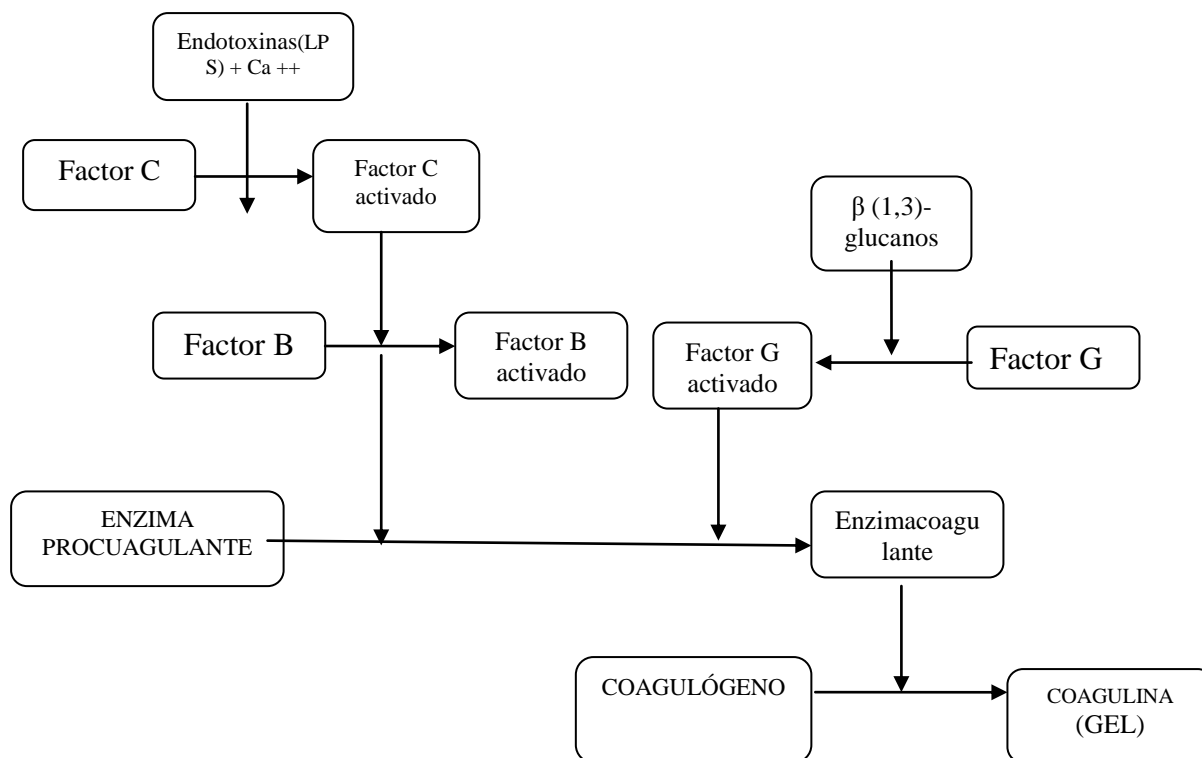
1.3.1.4 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción se basa en que la endotoxina presente reacciona en presencia del reactivo activando una proenzima como la trombina, tripsina y el factor X del LAL, además esta activación también depende de la presencia de cationes metálicos divalentes presentes como el calcio o manganeso.

La proenzima activada reacciona con el coagulogéneo, una fracción proteínica de bajo peso molecular también presente en el LAL. Encendiéndola en subunidades coaguladas con una parte solubles en donde se produce mayor coagulación y otra parte insoluble, que se puede ver también como una solución turbia o precipitado, esto dependiendo de la cantidad de coagulogéneo insoluble formado por el producto.³⁴

³³SOLIS, Jenny. 2004

³⁴PERDOMO, Rolando. 2004



**FIGURA N°4. Cascada de coagulación de las endotoxinas frente al reactivo LAL.
ELABORADO POR: KRISTIAN LLANGA, 2014**

1.3.1.5 Sensibilidad del LAL

Se define como la cantidad mínima de concentración de endotoxina purificada que puede producir un gel firme, a condiciones establecidas de tiempo y temperatura.³⁵

1.3.1.6 Características

- Más seguridad
- La prueba se desarrolla en menos tiempo
- De fácil realización.
- Mayor sensibilidad.
- Es más puntual.
- Mejor especificidad.
- Existe una menor variación.
- Se obtiene resultados cuantitativos.
- Menos costosa.

³⁵ENDOSAFE. U.S. License. 2013

1.3.2 MÉTODOS DEL ENSAYO DE LAL

Hay tres principales métodos de ensayo LAL: gelificación, turbidimétricos y métodos cromogénicos, los dos últimos podrán agruparse como métodos fotométricos, ya que requieren un lector óptico.³⁶

1.3.2.1 Método turbidimétrico

Se basa en la turbidez o densidad óptica que acompaña a la reacción de coagulación, se lee en un lector de micro placas de incubación o tubos Pyros. Alcanza hasta una sensibilidad máxima de 0.001 EU/mL siendo la más alta a nivel de sensibilidad disponibles en la industria de LAL lo que nos permite una mayor dilución para superar interferencias además de optimizar.³⁷

1.3.2.2 Método cromogénico

En este método el reactivo coagulogénico es remplazado por un sustrato cromogénico (péptido sintético unido covalentemente a un cromóforo (p-nitroanillida), este cambio puede ser parcial o totalmente.

En la reacción de la endotoxina con el reactivo se forma un color amarillento que se determina espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405nm por interpretación de una curva patrón, confirmando la presencia de endotoxina en el producto y que es equivalente a la cantidad de endotoxina.³⁷

1.3.2.3 Método GEL-CLOT

Es un método semicuantitativo, puesto que el punto final del ensayo se halla entre la mayor dilución de la muestra que presenta un gel firme y la dilución inmediatamente anterior.

Esencialmente la prueba consiste en la adición cantidades iguales del lisado y del producto a evaluar en tubos despirogenizados, que se ponen condiciones establecidas por farmacopeas luego de estudios y aprobación (baño de maría de 37°C por una hora) pasado este tiempo de inmediato se invierte el tubo 180° y se observa la formación de un

³⁶ASSOCIATES OF CAPE COD INC. 1999

³⁷CARO, N. y otros. 2006

gel que permanece en el fondo del tubo, si ocurre de esta manera la prueba es positiva, es negativa la prueba si la solución permanece líquida o que al girar el tubo esta se desploma.³⁸

1.3.3 INTERFERENCIAS DE LA TÉCNICA LAL

Pueden existir varios factores de interferencia durante la realización de la prueba, los más comunes son:

1.3.3.1 Inhibición

Es el tipo de interferencia más frecuente que puede mostrarse por la disminución en la sensibilidad de LAL. Todo producto debe ser comprobado previamente para comprobar la ausencia de inhibición ya que arrojar resultados falsos positivos.

Entre los factores de inhibición más comunes tenemos.

- El pH es muy importante para la realización de la prueba debido a que el reactivo tiene una capacidad limitada de tamponación y requiere de un pH óptimo para su realización.
- Algunos cationes divalentes pueden neutralizan la carga negativa de las endotoxinas e incrementan agregación disminuyendo su actividad o la potencia, además la sal reactiva puede inhibir la reacción.
- Agentes Quelantes como el EDTA, Heparina, enlazan cationes divalentes también pueden interferir en el ensayo.
- También algunas partículas en los tubos como material de vidrio, resto de NaOH causan interferencias inhibiendo la formación de un gel compacto.
- Todos estas particularidades en general que arrojan resultados erróneos o falsos positivos se puede comprobar que una prueba de ausencia de la endotoxina. Si los resultados indican un incremento repentino, se debe buscar primero

³⁸SALAS, M. 2001

contaminación de endotoxinas y luego realizar cambios de formulación en el producto o proceso.³⁹

1.3.3.2 Potenciación

Los factores de potenciación van a dar un incremento en la sensibilidad del reactivo, detectando en la muestra más endotoxinas de las existentes, para detectar la presencia de estos factores es colocando cierta cantidad de CSE de concentración conocida y comprobarlo en el ensayo de LAL. Si la cuantificación de endotoxinas resulta mayor que la cantidad conocida adicionada, se habla del fenómeno de potenciación.⁴⁰

1.3.3.3 Falsos positivos

Existen ciertos casos aunque bastantes raros en los que pueden presentarse resultados falsos positivos en la realización de la prueba, estos resultados se obtienen por la presencia de sustancias que activan el LAL diferentes a las endotoxinas, ellos sugieren que las endotoxinas están presentes cuando en realidad no es así.

Para reconocer un falso positivo, debe conocerse la naturaleza del producto y el proceso de fabricación. Se sabe que sustancias como la tripsina y glicanos pueden ser causantes de resultados falsos positivos.⁴⁰

1.4 VALIDACION DE LA PRUEBA LAL POR EL METODO DE GEL-CLOT

La validación de prueba LAL busca confirmar que el procedimiento analítico utilizado es adecuado para su uso previsto en productos de administración parenteral.

Los resultados de la validación del método pueden utilizarse para juzgar la calidad, la fiabilidad y la constancia de los resultados analíticos. Se debe conocer ciertas características de los componentes implicados, además de los ensayos preliminares para la realización de la validación.⁴¹

³⁹COOPER J.1999

⁴⁰MOROTE M y otros. 2002

⁴¹ OSORIO, Claudia. 2011

1.4.1 ESTÁNDAR PRIMARIO DE ENDOTOXINA

Para la realización de la prueba se ha visto la necesidad de desarrollar un estándar primario, es así que la FDA desarrolla el primer estándar de endotoxinas preparado a partir de *Escherichia coli* O 113: H10: K.⁴²

Cabe mencionar que en la prueba antes desarrollada para la determinación de pirógenos en conejos no era necesario utilizar estándares, pero una vez que se comenzó a usar la prueba LAL, fue necesario emplear uno.

1.4.2 ESTÁNDARES SECUNDARIOS

Son preparaciones de endotoxinas diferentes al RSE primario cuya relación de actividad es declarada por el fabricante. En la práctica la mayoría de veces se emplean estándares secundarios los cuales han sido Estandarizados contra un Estándar USP que ofrecidos por diferentes casas comerciales como Charles River Endosafe, Associates of Cape cod, entre otras.

Un estándar secundario debe ser utilizado hasta un mes después de su reconstitución, y guardarse herméticamente tapado, a una temperatura de 2 a 8° C y correctamente rotulados indicando la fecha de reconstitución. Cada lote debe venir con su respectivo certificado que documente la equivalencia del CSE al estándar USP.⁴³

1.4.3 MÁXIMA DILUCIÓN VÁLIDA (MDV).

La dilución válida máxima es la dilución máxima permitida de un espécimen en la que el límite de endotoxina se puede determinar, aplicable en inyectables o soluciones de administración parenteral reconstituidos o diluidos para su administración o en su caso, a la cantidad de fármaco en peso si el volumen de la forma de dosificación para la administración podría variar, la ecuación general para la determinación del MDV es la siguiente.⁴⁴

⁴² <http://www.usp.org/es/inicio-de-asistencia-tecnica/estandares-de-referencia>

⁴³ CARRILLO, C. 2006

⁴⁴ USP- 27 NF 22. 2004

$$\text{MDV} = \frac{\text{Límite de endotoxina} \frac{\text{UE}}{\text{ml}} \times (\text{concentración de la muestra})}{\text{Sensibilidad de LAL}}$$

A continuación se detalla cada uno de los componentes específicos para la determinación del máximo valor de dilución.

1.4.3.1 Límites de endotoxina.

Es el máximo valor de endotoxinas que puede ser administrada en cantidad por hora a un paciente sin causar síntomas de una infección pirogénica, este valor es de 5UE/Kg de peso, haciendo referencia en peso promedio para un adulto de 70 Kg, lo que nos da una dosis de administración total de 350 UE por hora.⁴⁵

Para la administración por vía parenteral, el límite es 0,2 UE/Kg por hora y para volúmenes grandes de parenterales el límite es de 0,5 UE/mL, para productos que no se encuentra referenciado el límite de endotoxina se puede encontrar aplicando la siguiente fórmula.

$$\text{Limite de endotoxina} = \frac{K}{M}$$

Dónde K es la cantidad de endotoxina a ser administrada a un paciente por hora y M representa la dosis máxima de referencia del producto a ser administrado por kilogramo de peso. Los valores representativos de límite de endotoxinas para cada producto (materias primas o productos terminados) podemos encontrarlos en las farmacopeas.⁴⁶

1.4.3.2 Concentración de la muestra

La concentración de la muestra nos indica que cantidad de activo está presente en el inyectable presentado en solución.⁴⁷

1.4.3.3 Sensibilidad del LAL

La sensibilidad viene especificada en el membrete del reactivo y respaldado con un certificado, esto es para cada lote.

⁴⁵DAWSON, M. 1997

⁴⁶FOOD AND DRUGADMINISTRATION. 1999

⁴⁷GISBERG ECUADOR S.A. 2014

1.4.4 VALIDACIÓN DEL REACTIVO Y OPERARIO

Este ensayo se aplica tanto para validar el reactivo y de paso el analista que por primera vez desarrolla este tipo de análisis con el objetivo de adiestrarse para obtener resultados confiables y seguros. Para esta prueba se trabaja por cuadruplicado en donde se realizan diluciones seriadas de CSE obteniendo concentraciones de 0.5 UE/ml o 2λ , 0.25UE/ml o 1λ , 0.125UE/ml o 0.5λ y 0.06UE/ml o 0.25λ , donde las UE/ml o λ representa la sensibilidad del reactivo de LAL marcada.⁴⁸

Se estableció una desviación estándar con un valor máximo del 99% que representa un 0.365, valores inferiores a este límite permite considerar una variabilidad confiable.

Mediante la siguiente formula se determina la concentración del punto final de la sensibilidad calculando la media geométrica de los valores encontrados en la prueba.

$$MG = \text{Antilog } X$$

Donde x es equivalente a la sumatoria de los logaritmos de los puntos finales de cada repetición dividido para el número de réplicas realizadas. El error aceptable del método es +/- 1.⁴⁹

1.4.5 VALIDACIÓN DEL PRODUCTO

1.4.5.1 Ensayos preliminares

Se prepara una serie de diluciones hasta el MVD y por triplicado para alcanzar o determinar que la concentración del inyectable que se está ensayando no interfiere de forma significativa con la prueba.

Primero se realiza una serie de tubos en la que se va a hacer una prueba de control positivo con la adición de la endotoxina (**Spike**) a una cierta concentración y en la otra serie no se adiciona endotoxina (**Unspike**) conocida también como control negativo.

⁴⁸CORTES Natalia. 2006

⁴⁹SOLIS, Jenny. 2004

En la prueba de control positivo es decir en la que se haya introducido endotoxinas (spike) se debe presentar la formación de un gel y de esta forma se establece la dilución de trabajo del producto, de no presentarse la formación del gel se presume interferencias por parte del producto.⁵⁰

1.4.5.2 Ensayo de validación del producto final

Sirve para determinar la concentración de endotoxinas en la muestra que se está analizando, en base a los resultados obtenidos en los ensayos preliminares.

1.5 INDUSTRIA FARMACÉUTICA

La industria farmacéutica es un ente de mucha importancia a nivel mundial en el área de salud debido a su avance de proyecciones salubristas, desarrollo, investigación, fabricación, distribución y comercialización de medicamentos destinados a prevenir o tratar diversas enfermedades y como tal está interesado en ofrecer al mercado medicamentos de calidad que cumplan con parámetros dándole seguridad y confianza a los pacientes.

Tales parámetros que permitan certificar la calidad durante todo el seguimiento del medicamento son los que se mencionan a continuación.⁵¹

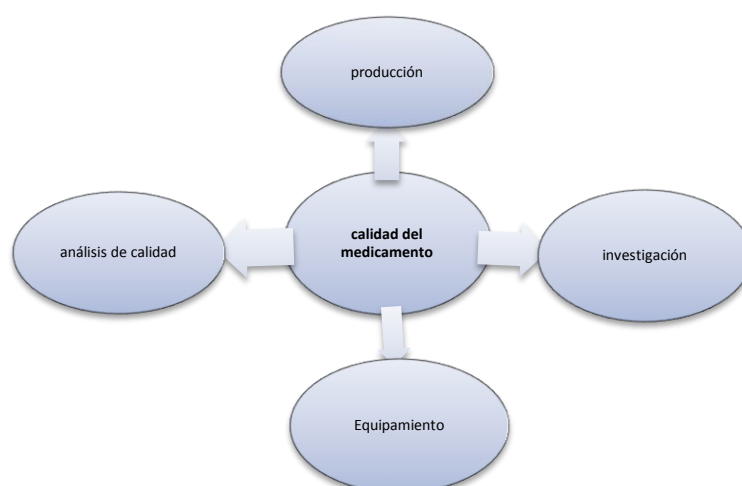


FIGURA N° 5. PARÁMETROS DE CALIDAD PARA LOS MEDICAMENTOS, REALIZADO POR KRISTIAN LLANGA, 2014

⁵⁰MOROTE M. 2002

⁵¹<http://www.telegrafo.com.ec/economia/item/la-industria-farmacautica-mejora-su-tecnolmantiene-su-crecimiento.html>

En el Ecuador la industria farmacéutica ha tomado un papel muy importante en estos últimos años debido a su progresivo crecimiento de mano factura, cumpliendo con las especificaciones exigidas por parte de organismo de regulación y monitoreo, así como el desarrollo e investigación logrando así desplazar medicamentos de marca registrada en un 60% y al mismo tiempo cubriendo una demanda requerida por parte de los consumidores.⁵²

En la actualidad observamos que los medicamentos genéricos van ganando terreno frente a los de marca, la industria nacional tiene la plena capacidad para abastecer la demanda institucional y se encuentra preparada para un proceso de sustitución de importadores, puesto que la capacidad instalada por lo que cuenta con un 60% disponible para hacer frente al aumento de producción. La producción nacional en los últimos años multiplico sus ventas institucionales cinco y seis veces, solo con la subasta inversa corporativa del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social (IESS).

La preparación de los fármacos no es solo en el área de tecnología, también se cumple con requisitos y normas internacional de manera periódica para asegurar la calidad al consumidor. La industria farmacéutica ha venido en crecimiento desde que se nacionalizo la producción de medicamentos desde entonces se ha extendido enormemente aumentando el volumen de ventas que se han generado por licitaciones, a tal punto que se ha logrado desarrollar a nivel nacional una producción de medicamentos que abastece todo la región Ecuatoriana.⁵²

1.5.1 INFORMACIÓN DE LA EMPRESA

1.5.1.1 Generalidades.

GINSBERG S.A. es una industria farmacéutica Ecuatoriana encargada de desarrollar y elaborar productos farmacéuticos para consumo humano en sus diferentes formas farmacéuticas por más de 10 años, cuenta con infraestructura adecuada y un grupo de profesionales y técnicos capacitados, lo que le permite ofrecer productos de excelente calidad para ser distribuidos en todo el país.⁵³

⁵² http://emplea.universia.es/informacion/sectores_profesionales/industria_farmaceutica/

⁵³ GISBERG ECUADOR S.A. Bibliografía interna, derechos reservados. 2014.

1.5.1.2 Misión

Elaborar productos farmacéuticos orientados a satisfacer necesidades específicas del mercado, manteniendo estándares de calidad a nivel nacional e internacional.⁵⁴

1.5.1.3 Visión

Llegar a ser líder en la fabricación de medicamentos por medio de la innovación e implantación de nuevas y modernas tecnologías que marcan la diferencia a nivel nacional.⁵⁴

1.5.1.4 Políticas de calidad

GINSBURG ECUADOR S.A. presta servicios de manufactura y acondicionamiento de productos farmacéuticos para consumo humano en las diferentes formas farmacéuticas, los cuales cumplen las normativas técnicas y de salubridad, garantizando un producto de calidad, para satisfacer a los clientes y alcanzar su lealtad, con personal capacitado y motivado que busca el mejoramiento continuo a través del compromiso de la Gerencia General, el cumplimiento de las normas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y del sistema de gestión de calidad implementando bajo la norma ISO 9001.⁵⁴

1.6 SOLUCIONES INYECTABLES

Se entiende por inyectables a las soluciones parenterales acuosas o a veces en aceite, estériles que vayan a ser administrados atravesando una o más capas de la piel o de las membranas mucosas usando la gravedad o fuerza mediante una inyección. Es importante saber y determinar que los inyectables deben estar libres de partículas de sustancias extrañas y de pirógenos.⁵⁵

⁵⁴GISBERG ECUADOR S.A. 2014.

⁵⁵USP 35 – NF 30. 2012

1.6.1 MANUFACTURA DE LA SOLUCIÓN INYECTABLE DE HIALURONATO DE SODIO.

El control de calidad tiene por objetivo determinar las pruebas y controles que se deben realizar en todos los productos inyectables y en cada uno de sus lotes producidos en el Área Estéril, incluyen pruebas fisicoquímicas, detección de partículas extrañas, defectos de sellado, volumen de llenado, ensayo de esterilidad y la prueba de endotoxina bacteriana, etc. especificados en POES y registros internos.

Pero el control mismo va más allá del análisis del producto terminado, sino tomando en cuenta todos los procesos, materiales, materia prima que están inmiscuidos dentro de la producción, tomando en cuenta los puntos de control más críticos en donde puedan afectar al producto. El esquema de producción tomando en cuenta estos puntos se detalla a continuación.⁵⁶

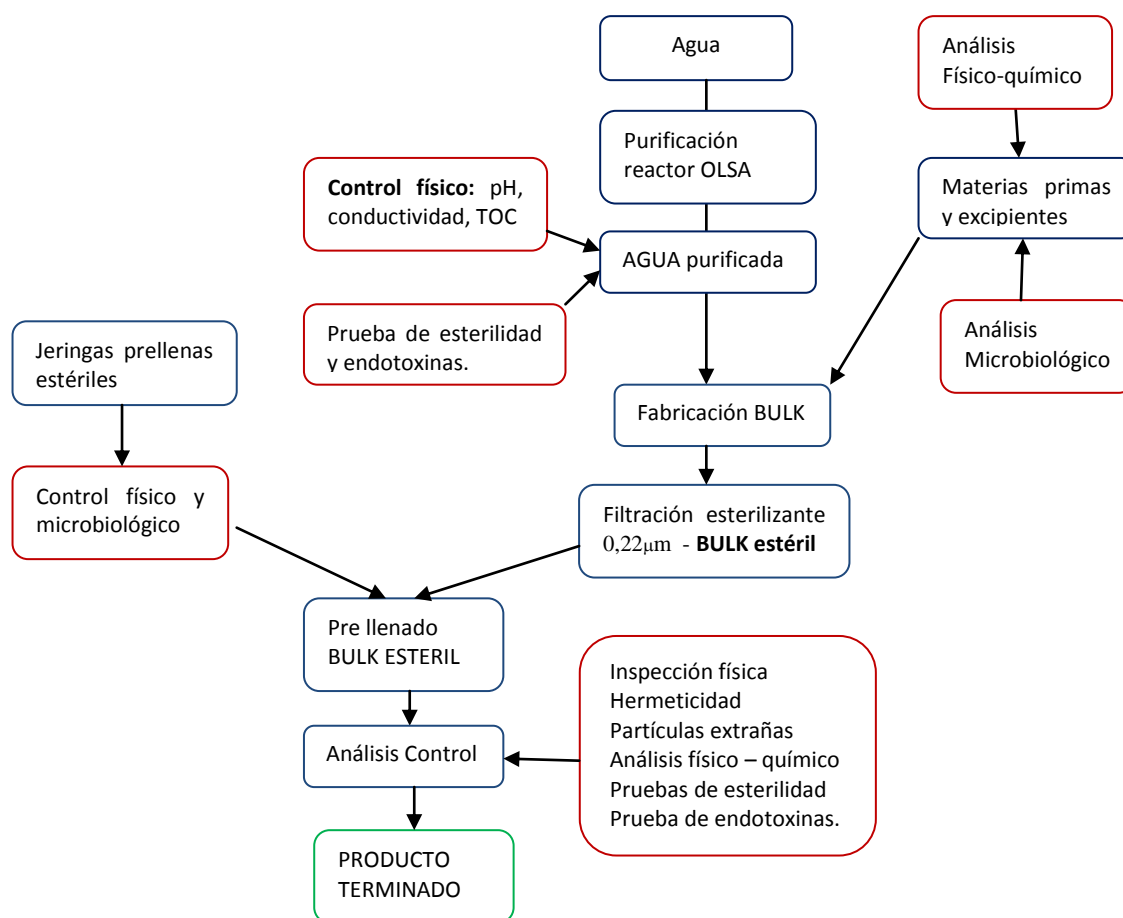


FIGURA N.- 6. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA PRODUCCIÓN DE INYECTABLES. KRISTIAN LLANGA, 2014

⁵⁶ AGUILERA N. 1999

1.6.2 CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS INYECTABLES.

1.6.2.1 Análisis físico químico de las materias primas y excipientes

Se analiza según especificaciones requeridas mediante metodologías internas o basadas en farmacopeas, como pruebas de identidad, pureza, humedad, etc.

1.6.2.2 Análisis material envase empaque

Se realiza un riguroso análisis, basados en metodologías internas de material envase empaque, y análisis de esterilidad bajo condiciones aceptables para este tipo de análisis.

1.6.2.3 Análisis del agua.

Muy importante para el proceso de fabricación de inyectables, porque va a depender de su estado para cumplir con expectativas del producto, se realiza pruebas como pH, conductividad, análisis de carbono orgánico total (TOC) y las pruebas de endotoxinas bacterianas y esterilidad.

1.6.2.4 Análisis jeringas prellenas

Los productos que se preparan como soluciones deben examinarse visualmente para asegurarse de que no contengan partículas extrañas o defectos de solución. Además se debe verificar que sea el lote correcto y la información necesaria con respecto a la preparación, esterilización, envase y empaque.⁵⁷

➤ Inspección física

Se la realiza uno por uno y muy cuidadosamente colocando un fondo blanco o negro iluminados, de esta forma se comprueba la no existencia de partículas visibles ni otras materias extrañas.

➤ Inspección de la integridad del sistema

Del envase-cierre y cualquier otro defecto visual evidente.

⁵⁷MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. 2002

➤ **Prueba de esterilidad**

Se ejecuta para comprobar la no presencia de contaminación por microorganismo. La ausencia de contaminación microbiana, evidenciada por este método, confirma que el producto cumple con los requerimientos del ensayo aunque el mismo no es suficiente para aceptar la total esterilidad del lote analizado. Para el desarrollo de esta prueba se utiliza medios de cultivo como el caldo Tioglicolato y el caldo digerido de soya Trypticasa, a condiciones de temperatura y tiempo especificados.⁵⁸

➤ **Prueba de endotoxinas bacterianas LAL**

Para la determinación de pirógenos presentes en cada lote producido en el área estéril. Los límites para la prueba de endotoxinas bacterianas se obtienen en las monografías individuales de la USP, en el caso de que no se indique este límite de endotoxinas bacterianas no deberá exceder la cantidad de Unidades USP de endotoxinas que es igual a una UI (unidad internacional) de endotoxinas, (Unidades por hora por kg de peso corporal o metros cuadrados de superficie corporal)⁵⁹

➤ **Identificación y concentración de los ingredientes activos presentes en el inyectable.**

De acuerdo a las técnicas individuales en cada caso y verificando según las especificaciones permitidas y que el contenido declarado por dosis debe ser exacto.

1.7 ALURONIC® Blispack.

1.7.1 DATOS GENERALES DEL PRODUCTO

1.7.1.1 Composición

Cada jeringa prellenada por 2,5 ml contiene 25 mg de Hyaluronato de sodio más excipientes c.s.⁶⁰

1.7.1.2 Presentación

Solución inyectable, jeringa prellenada x 2,5 ml

⁵⁸ARIAS J. 2005

⁵⁹SOLÍS Ascencios. 2004

⁶⁰GISBERG ECUADOR S.A. 2014

1.7.1.3 Vía De Administración

Administración exclusiva por vía intraarticular por especialistas con experiencia en terapia intraarticular.

1.7.1.4 Almacenamiento

Producto de uso delicado, Almacenar a una temperatura no mayor a 25°C, protegido de la luz, no debe congelarse.

1.7.1.5 Elaborado por

Laboratorio GINSBERG Ecuador S.A. Quito-Ecuador.

1.7.2 JERINGA PRELLENA

En la actualidad la jeringa prellenada es muy utilizada, debido a múltiples beneficios que ofrece frente a las jeringas vacías, siendo de mayor conveniencia en su utilización y facilidad de manejo, así como en la seguridad de dosis, entre otras ventajas como:

- Mayor eficacia
- Reducción de la sobredosificación (y del costo)
- Reducción del riesgo de error o contaminación en la dosificación
- Aumento del bienestar del paciente
- Facilidad de uso y conveniencia para profesionales de la salud y pacientes⁶¹

1.7.3 HYALURONATO DE SODIO

El Hialuronato de sodio es una sal sódica del ácido hialurónico que está estructurado por unidades secuenciales y repetidas de un azúcar compuesto por glucuronato sódico N-acetilglucosamina unidos por enlaces glucosídicos b-1,3 y b-1,4 alternantes, conformando un polímero que pertenecen a los glicosaminoglicanos o llamados también mucopolisacáridos ácidos.⁶²

⁶¹<http://www.softigel.com/Plataformas-Tecnologicas/Esteriles.aspx?lang=es-CO>

⁶²<http://spanish.alibaba.com/product-gs/organic-sodium-hyaluronate-713449139.html>

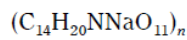
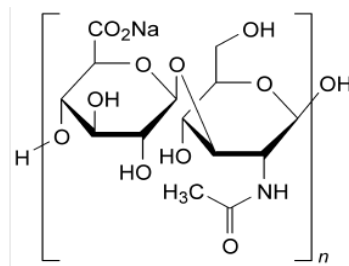


GRAFICO N°3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL HIALURONATO DE SODIO.
FUENTE: ORGANICA DEL HIALURONATO., <http://spanish.alibaba.com/products/organic-sodium-hyaluronate-713449139.html>

Su naturaleza y propiedades lubricante, viscoelasticidad e higroscopicidad hacen que sea un componente esencial del líquido sinovial que va a proteger las articulaciones de la fricción y rose que generan los movimientos.⁶³

1.7.3.1 Propiedades Farmacológicas

Mejora la propiedad articular del líquido sinovial normalizando alteraciones y dándole mayor movilidad. Aplicable en dolores producidos por inflamación articulares, osteoartritis, artrosis de rodilla, perneatitis del hombro, etc.⁶³

1.7.3.2 Farmacodinamia

El ácido hialurónico es un componente esencial del cartílago y líquido sinovial que se encuentra en grandes cantidades, proporcionando propiedades lubricantes y amortiguadoras en el líquido, mejorando la movilidad en articulaciones con superficie de cartílago desgastado o que a entrado en proceso degenerativo, además de ser efectivo en el tratamiento de infecciones del líquido sinovial.

Se ha demostrado y comprobado mediante ensayos clínicos que al administrar ácido hialurónico en forma de sal de hialuronato la mejora de síntomas de la artrosis durante 12 o más meses luego de haber terminado el tratamiento.⁶⁴

⁶³<http://www.socreum.sld.cu/farmacos/hialuronato.htm>

⁶⁴ADAMS R. 2010

1.7.3.3 Farmacocinética.

En Estudios farmacocinéticos se han demostrado que al administrar hialuronato de sodio interarticularmente su absorción es rápida, distribuyéndose por todo el líquido sinovial, la membrana sinovial, cartílagos, ligamentos y musculo adyacente.

Aunque la principal vía de metabolización del ácido hialurónico es la vía hepática se demostrado en estudios con animales que parte de su metabolismo ocurre en tejidos aledaños que rodean articulaciones no ocurriendo así en el líquido sinovial. Su eliminación del líquido es en 2 o 3 días que luego es eliminada por vía renal.⁶⁴

1.7.3.4 Mecanismo de acción

No se conoce totalmente, sin embargo, investigaciones experimentales y el uso clínico en los últimos años del Hialuronato de sodio han mostrado un efecto en la síntesis de proteoglicanos y la liberación de los condrocitos, además ha demostrado que normaliza la multiplicación de fibroblastos, células sinoviales y células del endotelio vascular, además interviene en la fagocitosis y quimiotaxis de los neutrófilos.⁶⁵

1.7.3.5 Contraindicaciones

Contraindicado para pacientes con hipersensibilidad al principio activo y derivados de la formula.

1.7.3.6 Restricciones de uso durante embarazo y lactancia

No se recomienda su uso en mujeres embarazadas o que presuman estarlo y en mujeres que estén dando de lactar debido a que el medicamento puede excretarse por la leche materna, por lo que se recomienda interrumpir la lactancia natural durante el tratamiento.

1.7.3.7 Reacciones adversas.

No se ha evidenciado reacciones adversas que haya provocado el producto, sin embargo hay que consultar con un médico cualquier alteración que se presente.⁶⁶

⁶⁵ <http://www.limpiezafacial.net/%C2%BFpara-que-se-utiliza-el-hialuronato-de-sodio/>

⁶⁶ ADAMS R. 2010

1.7.3.8 Efectos secundarios.

Dolor e hinchazón durante la punción interarticular, inflamación de la zona especialmente en pacientes con osteoartritis inflamatoria.

1.7.3.9 Interacciones Medicamentosas

No se ha presentado específicamente pero se debe tener cuidado frente a sales cuaternarias ya que pueden causar precipitaciones, tener cuidado en el uso de antisépticos locales.⁶⁶

1.7.4 ESTÁNDAR, MONOGRAFÍA OFICIAL USP

El estándar de Hialuronato de sodio de Referencia USP es una muestra física altamente caracterizada que las industrias farmacéuticas y otras relacionadas usan en sus análisis para ayudar a garantizar la identidad, potencia, calidad y pureza de medicamentos ya sea de fármacos, productos biológicos y excipientes, algunos suplementos dietéticos e ingredientes de alimentos.⁶⁷

Nuestro Estándares de referencia USP C33B ER SODIUM HYALURONATE SZE Grade USP, Batch: 300413-D1 vigente hasta el 30 de abril del 2017 usado tanto en elaboración como en control del producto elaborado.

1.7.5 ESPECIFICACIONES DE CALIDAD

Para la solución inyectable de ALURONICK Blispack, se determina mediante especificaciones internas basadas en la USP 35 – NF 30 y en la farmacopea Europea 5.0.

1.7.5.1 Determinación Hialuronato de sodio x HPLC

Se toma 1ml de la solución inyectable de Hialuronato de sodio y aforarlo con agua a volumen de 25ml. Determinar el porcentaje de pureza por cromatografía líquida de alta eficiencia frente a un estándar primario USP o secundario patronizado (25mg del estándar aforado a 25ml, con una alícuota de 4ml aforado en 10 ml con agua), a condiciones

⁶⁷USP 35 – NF 30. 2012

específicas de fase móvil con agua: acetonitrilo (60:40), flujo de 1ml/min, columna 5 u C18 (2) 100 A PHENOMENEX o su equivalente, y una longitud de onda de 201nm.⁶⁸

Concentración estándar:

$$conc St = \frac{Wst}{25} + \frac{4}{10}$$

Concentración muestra:

$$conc Mt = \frac{Wmt}{25}$$

mg de Hialuronato de sodio por jeringa prellenada:

$$mg hialuronato Na = \frac{Area Mt}{Area st} + \frac{Conc St}{Conc St} \times VP$$

Porcentaje de Hialuronato de sodio por jeringa prellena:

$$\% hialuronato Na = mg hialuronato Na \times \frac{100}{25}$$

CUADRO N 2. CRITERIOS DE CALIDAD DEL HIALURONATO DE SODIO.

CRITERIO	ESPECIFICACION
Aspecto	Solución inyectable transparente, libre de partículas
Volumen promedio	Mayor o igual a 2.5 ml
Identificación	(IR) Igual al estándar
pH	5.5 – 8.5
Pérdida por secado	Max 8.0%
Densidad	0.9 – 1.3 g/ml
ASSAY	9.0 -11.0 mg/ml
Microbiológico	
Endotoxinas Bacterianas	No más de 0.5 UE/ml para Hialuronato de sodio
Esterilidad	Pasa la prueba.

FUENTE: Metodología interna basada en la USP 35- NF 30, 2012

⁶⁸USP 35 – NF 30, 2012

CAPITULO II

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR DE PRUEBAS DE ENSAYO.

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio microbiológico del departamento de Control de Calidad de Laboratorios GINSBERG ECUADOR S.A. de la ciudad de Quito.

2.2 FACTORES DE ESTUDIO

Se consideró como factor de estudio de esta investigación la validación del método para la determinación de endotoxinas bacterianas.

2.2.1 MUESTREO

Para la validación de la prueba se realizó un muestreo al azar, correspondiente al inicio, mitad y al final de la producción de tres lotes diferentes.

2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Toda el área de desarrollo de la investigación debe ser sumamente estéril y se considerara factores de calidad a todo el material utilizado evitando así posibles contaminaciones que puedan afectar los resultados.

Los equipos deben estar calibrados, validados o calificados según sea el caso, el material de vidrio debe estar previamente despirogenado y los materiales plásticos apirógenados.

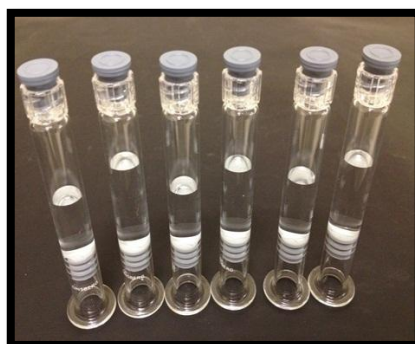
2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Muestras de ALURONIC Blispack, Hialuronato de Sodio 25 mg



FOTOGRAFÍA No.1 PRESENTACIÓN COMERCIAL ALURONIC BLISPACK SOLUCION INYECTABLE. GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. NOVIEMBRE DEL 2013.

- Hialuronato de sodio Sol inyectable
- Presentación: Jeringas prellenada 2,5 ml solución inyectable
- Lote: PILOTOS P13801, P13802 y P13803
- Proceso: interna, Control Universal.
- Cantidad de muestreo: 10 unidades por lote
- Fecha: 18 Noviembre 2013



FOTOGRAFÍA No. 2. PRESENTACIÓN JERINGAS PRELENAS DE ALURONIC BLISPACK, GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. NOVIEMBRE DEL 2013.

2.3.2 EQUIPOS

2.3.2.1 Cabina de flujo laminar



ELICROM		CALIFICACIÓN	
INSTALACIÓN:	<input type="checkbox"/>	OPERACIONAL:	<input checked="" type="checkbox"/>
DESEMPEÑO:	<input type="checkbox"/>		
EQUIPO / CÓDIGO:	CABINA DE FLUJO LAMINAR / LAB-033		
MARCA:	LABCONCO	MODELO:	HORIZONTAL
SERIE:	100729065P	ÁREA:	SIEMBRA
FECHA:	12-NOV-2013	VIGENCIA:	NOV-2014
REALIZADO POR:	d. Ruiz		

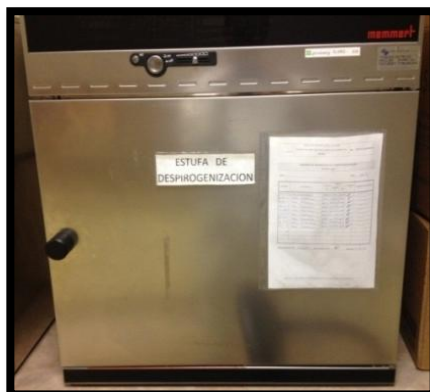
FOTOGRAFÍA No.3CABINA DE FLUJO LAMINAR LABCONCO CALIFICADA. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- **Marca:** LABCONCO
- **Modelo:** Horizontal CLEAN BENCH.
- **Serie:** 100729065P
- **Fecha de calibración:** 12 Noviembre 2013

Calificada por la empresa ELICROM con las siguientes especificaciones:

- Cumple con total amplitud con las exigencias requeridas en los ensayos estipulados de estabilidad y durabilidad
- Regulador de pantalla basado en un microprocesador con la tecnología de dos canales para temperatura y humedad y un indicador digital con una exactitud decimal para grados y porcentajes.
- sistema de humidificación y deshumidificación controlado por microprocesador

2.3.2.2 Horno de despirogenización



FOTOGRAFÍA No.4 HORNO DE DESPIROGENACIÓN MEMMERT. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Marca: MEMMERT
- Modelo: ILABQ.030
- Serie: C505.1126
- F calibración: 02 OCTUBRE 2013
- Observaciones: en perfecto estado, próxima revisión abril 2014

2.3.2.3 Agitador mecánico VORTEX Touch GLAS-COL



FOTOGRAFÍA No.5. AGITADOR MECANICO VORTEX. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Marca: TOUCH VORTEXER
- Modelo: Glas-Col Terre Haute
- Serie: N. 398824
- Fecha Calibracion: 24 diciembre 2012
- Vigencia 2 anos
- Condiciones: 1AMP 120 VOLTS

2.3.2.4 Baño maría TERMOBLOCK



FOTOGRAFÍA No.6 TERMOBLOCK, ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Marca: DRY BATH
- Modelo: SH-1002
- Serie: N-AS-SH2-112
- Fecha Calibración: 15 de Agosto 2013, vigencia 2 años
- Condiciones: Estabilidad corriente, capacidad 60 muestras por corrida.

2.3.3 MATERIALES DE LABORATORIO

Para la investigación se comprueba que todo el material debe estar despirogenado/ libre de endotoxinas, los materiales de vidrio usados en la prueba fueron despirogenados por calor seco a una temperatura de al menos 250°C por 2 horas con 40 minutos, el mismo día del análisis.

2.3.3.1 Micropipeta 100 μ l



FOTOGRAFÍA No.7 MICROPIPETA AUTOMÁTICA 100 μ l, ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Marca: BOECO Germany
- Modelo: BOECK 100
- Serie: CU50523
- Fecha Calibración: 24 Junio 2013
- Condiciones: Aprobada Calificación TECNOESCALA.

2.3.3.2 Micropipeta 1000 μ L



FOTOGRAFÍA No. 8 MICROPIPETA AUTOMÁTICA 1000 μ l. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Marca: BOECO Germany
- Modelo: BOECK 1000
- Serie: CU50524
- Fecha Calibración: 24 Junio 2013
- Condiciones: Aprobada Calificación TECNOESCALA.

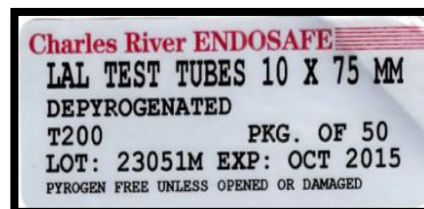
2.3.3.3 Cronómetro digital.



FOTOGRAFÍA No 9 CRONÓMETRO DIGITAL.ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

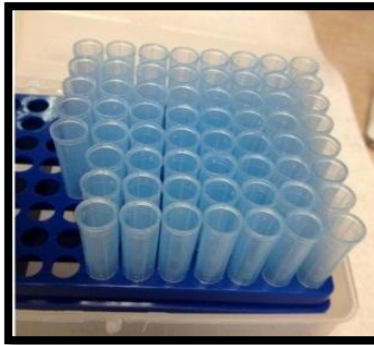
- Marca: JUNSD
- Modelo: JS-5000
- Serie:Ilab-154\

2.3.3.4 Tubos despirogenados



FOTOGRAFÍA No.10 TUBOS DESPIROGENADOS ENDOSAFE.ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

2.3.3.5 Puntas Despirogenadas



FOTOGRAFÍA No.11 PUNTAS DESPIROGENADAS PARA PIPETAS AUTOMATICAS.ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Marca: ENDOSAFE
- Lote: PPT25
- Especificaciones: 250 µl, 96 Tips Rack

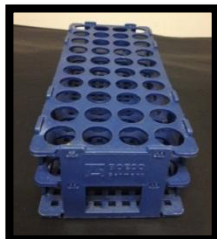
2.3.3.6 Tiras indicadoras de pH



FOTOGRAFÍA No.12 TIRAS INDICADORAS DE pH. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Tiras indicadoras de pH Marca MERCK
- LOTE: 1384728

2.3.3.7 Gradilla

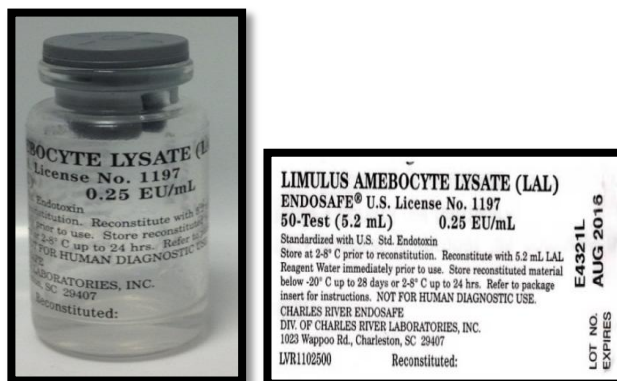


FOTOGRAFÍA No.13 GRADILLA AREA DE MICROBIOLOGIA, ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Marca: BOECO GERMANY
- Lote: No. 9820
- Especificaciones: Gradilla plástico 25x10x7 cm, capacidad 60.

2.3.4 REACTIVOS

2.3.4.1 Reactivo Limulus Amebocyte Lysate (LAL)



FOTOGRAFÍA No.14 REACTIVO DE LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE.ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Sensibilidad: 0.25 EU/ml
- Lote: E4321L
- Cantidad: 5.2 ml
- Fecha de expiración: Agosto 2016
- Fecha de reconstitución: 10 de diciembre de 2013

2.3.4.2 Control Estándar de Endotoxinas (CSE)



FOTOGRAFÍA No.15 REACTIVO CONTROL ESTANDAR DE ENDOTOXINAS.ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Estándar Control *E. coli* 005:B5 500NG
- LOTE: EM21152
- EXPIRA: Mayo 2016
- Fecha de reconstitución: 10 diciembre 2013.
- Mantener a temperatura no mayos a 4°C

Estándar de referencia de Endotoxinas RSE (Reference Standard Endotoxin) de la USP, liofilizado de Endotoxinas de *Escherichia coli* (O 113: H10) con una potencia de 10000 unidades de endotoxina (UE) por vial.

2.3.4.3 Agua calidad LAL.



FOTOGRAFÍA No.16 AGUA TIPO LAL. ÁREA DE MICROBIOLOGÍA DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD GINSBERG ECUADOR S.A. QUITO. FEBRERO DEL 2014.

- Agua tipo LAL ENDOSAFE®
- Código: W120
- Lote: 99732230
- Fecha de expiración: Junio 2016

2.4 TÉCNICAS

2.4.1 MUESTREO DEL PRODUCTO.

Se realizó un muestreo al azar tomando 10 muestras de tres lotes, un piloto y dos continuos de HALURONIC Blispack, correspondientes al inicio, mitad y final de la producción.

2.4.1.1 Número de réplicas para los ensayos.

El número de repeticiones a aplicarse en los ensayos siguientes están tomadas según especificaciones internas basadas en la USP 35- NF 30.

Para la prueba del rótulo o ensayo de confirmación de la sensibilidad del lisado y validación del analista se realiza por cuatuplicado, esto con el objeto de comprobar la repetitividad, reproducibilidad, precisión y robustez.

Los ensayos preliminares SPIKE& UNSPIKE se realizara por duplicado con el objeto de comprobar la repetitividad, reproducibilidad y precisión y el ensayo del producto se realizara por triplicado, a fin de verificar la idoneidad de la dilución de trabajo.

2.4.2 ENSAYOS PRELIMINARES

Todas las operaciones en la preparación de reactivos se llevaron a cabo en condiciones adecuadas de asepsia, para evitar contaminaciones a afecten el resultado final. La reconstitución de los reactivos se realizó solo al momento de ser utilizados.

2.4.2.1 Preparación del Control Estándar de Endotoxina (CSE)

La reconstitución se la realiza con agua tipo LAL y a volumen indicado en el membrete una vez comprobado el lote, fecha de caducidad y potencia del reactivo.

Retiramos cuidadosamente el protector metálico del envase que contiene el CSE, añadimos 5 ml de agua tipo LAL y lo cubrimos con parafilm teniendo cuidado de no tocar con la mano los bordes. Mezclamos bien por 1 minuto en el vortex y dejamos reposar a temperatura ambiente.

2.4.2.2 Preparación del reactivo del Lisado Amebocitos Limulus (LAL)

Se reconstituye el vial del reactivo LAL de acuerdo a las condiciones del certificado del proveedor, utilizando un volumen de agua tipo LAL indicado en el membrete, se mezcla suavemente hasta disolución completa y teniendo cuidado de no agitar para evitar la formación de espuma.

2.4.2.3 Metodología GEL-CLOT de la prueba LAL en el producto.

En razón de la factibilidad de aplicación y realización del método GEL-CLOT de la prueba LAL, con resultados confiables y fáciles de interpretar se aplica al producto en mención ALURONIC Blispack 25mg/2.5ml solución inyectable.

La validez de los resultados obtenidos en la determinación de Endotoxina bacterianas, requieren de una demostración adecuada de que el material de prueba al cual se le aplica este método, no inhibe ni aumenta la reacción, además de no causar otro tipo de interferencia con la prueba, por lo que se realizará los siguientes ensayos:

2.4.2.3.1 Cálculo del máximo valor de dilución (MVD)

Aplicable a todas las soluciones que se va a realizar una prueba LAL, a soluciones diluidas de administración oral, local o parenteral de forma reconstituida o diluida. Se calcula el MDV del producto según la siguiente ecuación general:

$$\text{MVD} = \frac{(\text{límite de endotoxinas} \times \text{Concentración de la muestra})}{\text{sensibilidad LAL } (\lambda)}$$

La sensibilidad del reactivo LAL declarada en la etiqueta en unidades de UE/ml. La concentración de la solución es específica del producto a analizar, en este caso 25 mg/ 2.5mL y el límite de endotoxina del producto esta evidenciada en farmacopeas, de no existir se calcula de la siguiente forma:

$$\text{límite endotoxinas} = \frac{K}{M}$$

Dónde:

K = 5 UE/kg constante para todos los productos inyectables.

M = Es la dosis máxima de referencia del producto por Kg de peso de una persona normal de 70 Kg, que en nuestro caso para el Hyaluronato de sodio.

2.4.2.4 Desarrollo del Sistemas de diluciones

Las diluciones se representan gráficamente de la siguiente manera, donde se trabaja de forma secuencial.

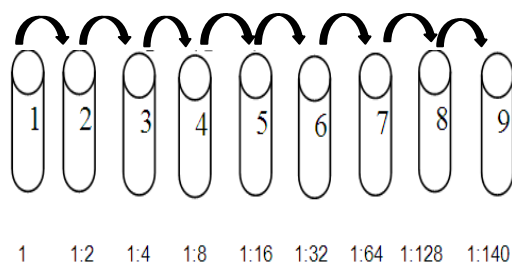


FIGURA N.7ESQUEMA DEL SISTEMA DE DILUCIONES DE ORDEN SECUENCIAL.

Elaborado por: kristian Llanga 2014

2.4.3 DESARROLLO DE LA VALIDACIÓN

2.4.3.1 Preparación de las diluciones del CSE

En condiciones adecuadas reconstituir el vial de CSE con 5ml de agua tipo LAL, obteniendo una concentración de 1000UE/ml. y realizamos una serie de diluciones hasta obtener la concentración especificada del estándar.

Colocamos una fila de seis tubos despirogenados y rotulamos de la siguiente forma A, B, G, D, E y F. Al tubo A añadimos 100µl de la solución original con 9900µl de

agua LAL despirogenada, obteniendo una concentración de 10UE/ml o 40 en el tubo B colocamos 100µl del tubo A y 900µl de agua tipo LAL obteniendo una concentración de 1UE/ml o 4 λ. En el tubo C colocamos 500 µl del tubo B y 500 µl de agua tipo LAL, obteniendo una concentración de 0,5 UE/ml o 2 λ. En el tubo D colocamos 500 µl del tubo C y 500 µl de agua tipo LAL, obteniendo una concentración de 0,25 UE/ml o 1 λ. al tubo E colocamos 500 µl del tubo D y 500µl de agua tipo LAL, obteniendo una concentración de 0,125 UE/ml o 0.5 λ, finalmente al tubo F colocamos 500 µl del tubo E y 500 µl de agua tipo LAL, obteniendo una concentración de 0,06 UE/ml o 0.25 λ.

De esta forma obtenemos una concentración de endotoxinas para llevar a cabo las diferentes pruebas que nos confirme la validación de la prueba.

2.4.3.2 Confirmación de la sensibilidad LAL (Rotulo $\lambda = 0.25$ UE/ml)

La sensibilidad del reactivo se define como la sensibilidad que tiene el reactivo para reaccionar con una concentración mínima de endotoxinas necesarias para dar un resultado positivo, en esta prueba se verifica esta sensibilidad declarada en el rotulo que esta expresado como lambda (λ) y con rango de aceptabilidad de 0,5 a 2 para un reactivo de sensibilidad de 0,25.

Se realiza cada vez que se adquiera un nuevo lote del reactivo LAL para luego ser usado en otras determinaciones y es usada para verificar si el reactivo tiene la misma sensibilidad frente a un estándar certificado. En este análisis incluye la calificación del analista por lo que se realiza la prueba por cuatriplicado.

2.4.3.2.1 Procedimiento.

Para realizar las diluciones seriadas se parte de la solución concentrada a temperatura de 20-25°C y con agitación vigorosa antes de usarse. Cada dilución debe agitarse por lo menos durante 30 segundos antes de continuar con la siguiente dilución.

Bajo cabina de flujo laminar, en una gradilla colocar 6 tubos despirogenados respectivamente rotulados y que contengan 100 µl de cada una de las CSE preparadas

anteriormente: 4λ, 2 λ, 1λ, 0.5λ y 0.25λ. El sexto tubo tomamos como control negativo del ensayo al que solamente añadimos 100 μl de agua despirogenada.

Añadimos a cada tubo 100 μl del reactivo LAL 0.25 UE/ml recién reconstituido comenzando por el blanco y luego con los controles positivos desde la concentración más baja, Agitamos la gradilla con los tubos durante 30 segundos e incubamos a 37°C durante 1 hora, evitando algún movimiento alrededor durante este tiempo.

Una vez transcurrido 1 hora se procede a realizar las lecturas ordenadamente y con mucho cuidado, para la lectura se coge cada tubo y se invierte en un solo movimiento a 180°, Si se forma un gel que no se desprende una vez que se a invertido al primer movimiento se anota como positivo (+), pero si después de invertirlo no se mantiene el gel formado el resultado es negativo (-), Reportamos los resultados de cada tubo hallando el punto final de cada serie, ENDPOINT que es la concentración mínima de endotoxinas de una serie de concentraciones decrecientes que coagula o como la mayor dilución que da resultado positivo seguida de una dilución que resulte negativa.

Finalmente determinamos la sensibilidad del reactivo obteniendo la media geométrica que es igual al promedio de los logaritmos de la última dilución positiva de cada replica y finalmente obteniendo el antilogaritmo de este valor.

2.4.3.3 Ensayo UNSPIKE (Diluciones de producto sin adición de endotoxina bacteriana)

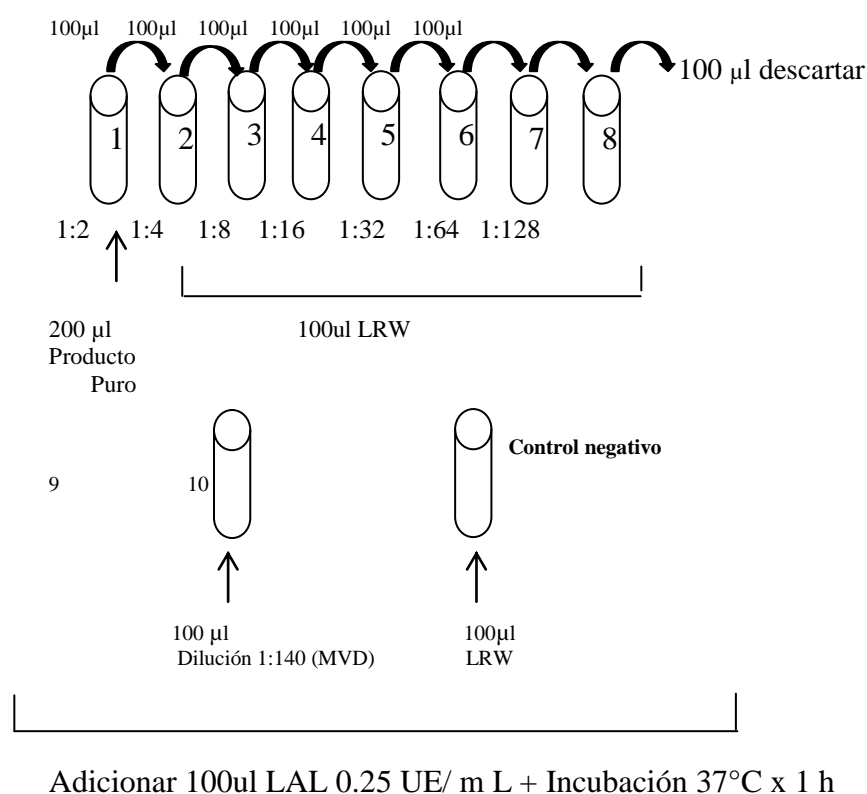
En el ensayo UNSPIKE (prueba para detectar realce), se prepara una serie de diluciones del producto que van a servir como blanco para descartar falsos negativos y para ayudarnos a determinar la pureza del lote, este ensayo se lo realiza una sola vez cuando se va a trabajar por primera vez en el inyectable, En algunas ocasiones se va a necesitar de un ajuste de pH.

Para la realización del ensayo se considera valor de dilución máxima y se procede de la siguiente manera.

Preparamos una serie de tubos respectivamente rotulados del 1 al 10 de acuerdo a las diluciones que resultan según los cálculos, trabajando cada dilución por triplicado.

Colocamos en el tubo 1, 200µl de muestra sin diluir (producto puro), adicionar a los tubos del 2 al 8, 100 µl de agua tipo LAL, Tomamos 100µl de la muestra del tubo 1 y colocarla en el tubo 2, agitando cuidadosamente la mezcla, del tubo 2 tome 100 µl y adiciónelo al tubo 3, agite la mezcla y realice el mismo paso hasta terminar la serie de tubos. Al final desechar los últimos 100 µl del tubo 8. Adicionamos en el tubo 9, 100 µl de la dilución 1:140(MVD), el tubo 10 utilizamos como control negativo, adicionando al mismo 100 µl de LRW

Añadimos a todos los tubos de reacción 100 µl del LAL 0,25 EU/ml, incluyendo al control negativo, seguidamente agitar cuidadosamente e incubamos a 37°C por una hora, observamos y registrarnos resultados obtenidos invirtiendo a los tubos en un ángulo de 180°. Efectuamos la interpretación de los resultados obtenidos, tanto en el producto puro, como en la serie de diluciones, para seleccionar la dilución de trabajo.



**FIGURA 8. ESQUEMA DE PREPARACIÓN DEL ENSAYO PRELIMINAR UNSPIKE
ELABORADO POR: KRISTIAN LLANGA 2014**

2.4.3.4 Ensayo SPIKE (Diluciones de producto con adición de endotoxina bacteriana)

Este ensayo sirve para determinar si el producto ejerce inhibición o incremento en la reacción con el reactivo LAL, se prepara una serie de diluciones de producto en la que se aplica cantidades conocidas de endotoxinas (*E coli*), al igual que UNSPIKE se lo realiza una sola vez cuando se trabaja por primera vez en el producto inyectable.

En algunas ocasiones el ajuste de pH de los productos inyectables es requerido, si en los resultados que se obtienen en las pruebas preliminares se detectan inhibición a las máximas diluciones posibles, en el caso del producto sometido a prueba presenta un pH cercano a la neutralidad (6-8), por lo que para consideraciones del ensayo se evaluara el producto tal cual, el esquema general del ensayo SPIKE es el siguiente.

Preparamos una serie de tubos rotulados del 1 al 10 de acuerdo al cálculo del MVD que resultan según los cálculos, trabajando cada dilución por duplicado. Colocamos en el tubo 1, 190µl de muestra sin diluir (producto puro) mas 10 µl de endotoxina de concentración 10EU/ml. Añadimos a los tubos del 2 al 8, 100 µl de endotoxina de concentración 0.5EU/ml.

Realizamos diluciones seriadas de la muestra tomando 100ul del tubo 1 al tubo siguiente y así sucesivamente hasta completar la serie, desechando los últimos 100ul del tubo 8. En el tubo 9 colocamos 190ul de la dilución 1:140(MVD) más 10ul de endotoxina 10EU/ml, agitando cuidadosamente y desechando 100ul. El tubo 10 utilizamos como control negativo al que añadimos 100 µl de LRW.

Añadimos a todos los tubos de reacción 100 µl del LAL 0,25 EU/ml, incluyendo al control negativo, seguidamente agitar cuidadosamente e incubar a 37°C por una hora, transcurrido ese tiempo observamos y registramos los resultados obtenidos invirtiendo los tubos en un ángulo de 180°, al final interpretamos los resultados obtenidos, tanto en el producto puro, como en la serie de diluciones, para seleccionar la dilución de trabajo.

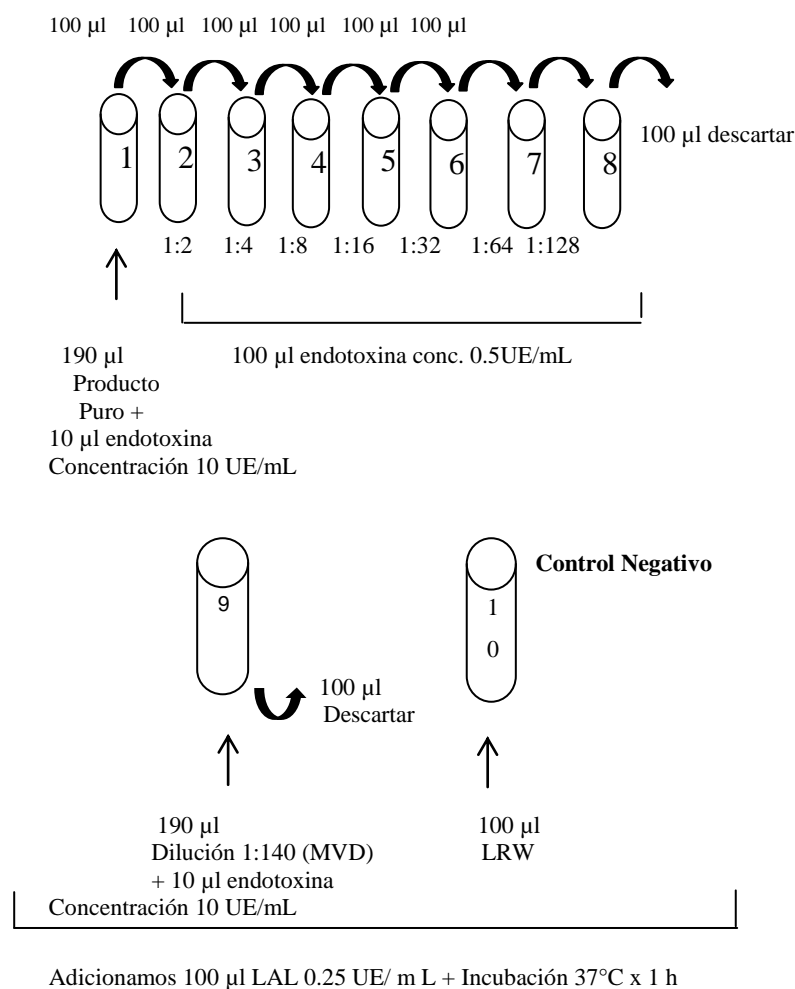


FIGURA 9. ESQUEMA GENERAL DEL ENSAYO PRELIMINAR SPIKE
Elaborado por: kristian Llanga 2014

2.4.3.5 Selección de la dilución de trabajo

La dilución de trabajo se establece en base a los resultados de la prueba preliminar SPIKE que nos muestra que no existe inhibición a tal concentración tanto en la muestra concentrada y diluida y considerando el realce evidenciado en la prueba UNSPIKE en la forma concentrada del producto.

2.4.3.6 Validación del producto

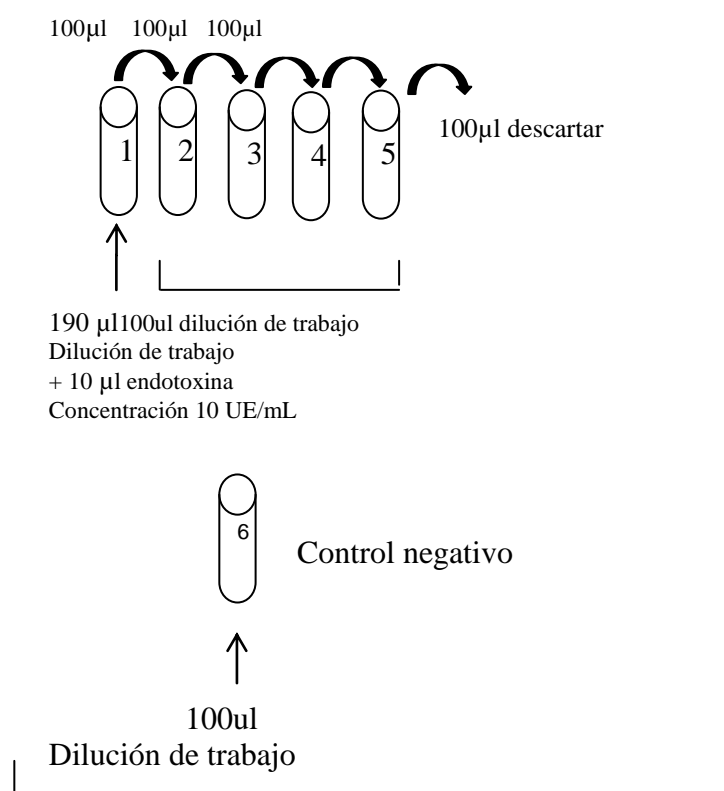
Se selecciona después de los ensayos preliminares con el fin de determinar una dilución óptima para el análisis teniendo en cuenta el máximo valor de dilución MVD y usando un reactivo de sensibilidad (λ) = 0.25 UE/ml, esta debe ser mínimo dos veces mayor que la primera dilución en la cual la interferencia no es evidente.

Se debe controlar el pH de la muestra para verificar que se encuentre entre 6.0 – 8.0, esto debido a que solo en este rango se produce la coagulación, de caso de no cumplir se debe emplear NaOH o HCl diluidos y previamente despirogenados.

Se realiza de la siguiente manera.

Preparamos una serie de tubos de acuerdo a las diluciones que resultan según los cálculos, trabajando por triplicado y rotulando todos los tubos del 1 al 6, colocamos en el tubo 1, 190µl de la dilución de trabajo y adicionamos 10µl de endotoxinas de concentración 10UE/ml, agitando cuidadosamente, a los demás tubos del 2 al 5, 100µl de la dilución de trabajo.

Pasamos 100µl del tubo 1 al tubo 2 y así sucesivamente hasta el tubo 5, desechando los últimos 100µl de tubo 5. En el tubo 6 (control negativo) colocar 100µl de la dilución de trabajo. Añadimos a todos los tubos 100µl del reactivo LAL 0.25UE/ml, incluyendo el control negativo.



Adicionar 100µl LAL 0.25 UE/ m L + Incubación 37°C x 1 h

FIGURA 10. ESQUEMA DE TRABAJO EN EL ENSAYO DEL PRODUCTO

Elaborado por: kristian Llanga 2014

Agitamos cuidadosamente todos los tubos e incubamos a 37°C por una hora. Después observamos y registramos los resultados obtenidos invirtiendo los tubos a un ángulo de 180°, Efectuamos la interpretación de los resultados obtenidos, tanto en el producto puro, en el control negativo, como en la serie de diluciones, para seleccionar la dilución de trabajo.

2.4.3.7 Ensayo de rutina

Se analiza por duplicado la dilución que fue estandarizada por la prueba anterior.

Colocamos 6 tubos despirogenados y codificados, 2 tubos con el nombre del producto, 2 como control (+) y 2 como control (-). En los dos primeros tubos colocamos 100 µl de producto diluido según la dilución de trabajo, en los tubo control (+) 100 µl de producto diluido más 10 µl de endotoxina 10UE/ml, y en los tubos (-) añadir 100ul de agua despirogenada. A todos los tubos añadimos 100ul de reactivo LAL, agitamos levemente, los cubrimos con parafilm e incubamos a 37oC durante una hora.

Leemos los resultados y anotamos según la formación del gel que se mantiene intacto una vez girado el tubo 180° como positivo o negativo, estos resultados registramos.

TABLA3. ESQUEMA INDICATIVO EN EL DESARROLLO DEL ENSAYO DE RUTINA

	RÉPLICAS	Dilución 1:32 del producto	CSE (10UE/ml)	Agua LAL	LAL 0.25
PRODUCTO	1	100 µl	-	-	100 µl
	2	100 µl	-	-	100 µl
CONTROL(+)	1	100 µl	10 µl	-	100 µl
	2	100 µl	10 µl	-	100 µl
CONTROL (-)	1	-	-	100 µl	100 µl
	2	-	-	100 µl	100 µl

2.4.3.8 Análisis estadístico

Dentro del análisis estadístico de la prueba LAL encontramos el cálculo de la media geométrica (MG) y de la desviación estándar (SD) de los logaritmos de los puntos finales, los cuales son los últimos tubos de la serie de réplicas que dan positivo en la prueba de endotoxinas bacterianas por el método de LAL, la media geométrica debe estar entre un rango de 0.5λ a 2λ (Associates of Cape Code, Inc. 1997), donde λ es la sensibilidad del LAL.

La USP y la FDA han establecido que la desviación estándar para cuatro réplicas, con un límite superior del 99% es de 0.365, los resultados menores a este límite de confianza estadístico se considera con variabilidad bajo control.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El producto seleccionado para esta prueba es ALURONIC Blispack que contiene Hyaluronato de sodio muestreado al azar correspondiente al inicio, medio y final del proceso de producción.

Se detalla todos los resultados de la prueba según los procedimientos aplicados.

3.1 CÁLCULO DEL MÁXIMO VALOR DE DILUCIÓN (MVD)

Obtenemos el valor máximo de dilución

$$\text{MVD} = \frac{\text{límite de endotoxinas} \times \text{Concentración de la muestra}}{\text{Sensibilidad LAL } (\lambda)}$$

Donde

- Sensibilidad LAL= 0.25 UE/ml
- Concentración ALURONIC Blispack: 25 mg/ 2.5mL
- y el Límite de endotoxina.

$$\text{Limite Endotoxinas} = \frac{K}{M}$$

K = 5 UE/kg (constante inyectables)

M = Dosis máxima de referencia del producto por Kg de peso de una persona normal (70 Kg). En nuestro caso para el Hyaluronato de sodio es 100mg.

$$M = \frac{100 \text{ mg}}{70 \text{ kg}}$$

$$M = 1.4286 \text{ mg/Kg}$$

El límite de endotoxinas es:

$$\text{límite endotoxinas} = \frac{5 \text{ UE/Kg}}{1.4286 \text{ mg/kg}}$$

$$\text{límite endotoxinas} = 3.4999 \text{ UE/mg}$$

El cálculo del máximo valor de dilución es:

$$\text{MVD} = \frac{3.4999 \frac{\text{UE}}{\text{mg}} \times \frac{25\text{mg}}{2.5\text{ml}}}{0.25 \frac{\text{UE}}{\text{ml}}}$$

$$\text{MVD} = 139.997$$

$$\text{MVD} = \mathbf{1:140}$$

Obteniendo el valor máximo de dilución nos indica que se realiza diluciones seriadas hasta un valor de 1:128 y la dilución final de 1:140.

3.2 PREPARACION DE LAS DILUCIONES DEL CSE

TABLA 4. PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DEL CSE.

Tubos	A	B	C	D	E	F
CSE	100 µl	100 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Agua LAL	9900 µl	900 µl	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl

Partiendo de la dilución inicial recién reconstituida de concentración 1000UE/ml, obtenemos las siguientes diluciones estándares de trabajo.

- **A**= 10 UE/ml o 40 λ.
- **B**= 1 UE /ml o 4 λ
- **C**= 0,5 UE /ml o 2 λ.
- **D**= 0,25 UE /ml o 1 λ
- **E**= 0,125 UE /ml o 0.5 λ
- **F**= 0,06 UE /ml o 0.25 λ.

3.3 CONFIRMACIÓN DE LA SENSIBILIDAD LAL (ROTULO λ = 0.25 UE/ml) Y VALIDACIÓN DE OPERARIO.

TABLA 5. RESULTADOS DEL PROCEDIMIENTO PARA LA CONFIRMACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL ROTULO.

TUBOS	CONCENTRACION DEL CSE (UE/ml)						P. F	Log Punto Final
	1.0	0.5	0.25	0.125	0.06	C (-)		
1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	0.25	-0.60205999
2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	0.25	-0.60205999
3	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.5	-0.30102999
4	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	0.5	-0.30102999
Media Geométrica							0.35	
S.D.							0.144	
Σ								-1.80617996

Calculo de la media geométrica

$$GM = \text{Antilog} \frac{(\log 0.25 + \log 0.25 + \log 0.5 + \log 0.5)}{4}$$

$$GM = \text{Antilog} - 0.451545$$

$$GM = 0.3535 \text{ UE/ml}$$

Se verifico la sensibilidad del rotulo del reactivo LAL mediante los en los cálculos estadísticos los resultados están dentro del rango de aceptación establecidos, la media geométrica entre 0.125- 0.5 UE/mly la desviación estándar<0.365 con estos resultados se califica al analista.

3.4 ENSAYO UNSPIKE

TABLA 6.RESULTADOS DEL ENSAYO PRELIMINAR UNSPIKE DE HIALURONATO DE SODIO

Replicas	DILUCIONES DE PRODUCTO									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PRODUC TO PURO	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:140	CN
1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

De acuerdo los resultados obtenidos en el ensayo UNSPIKE se determinó que el producto no presenta contaminación por endotoxinas, en toda la serie de diluciones efectuadas hasta el máximo valor de dilución.

3.5 ENSAYO SPIKE

TABLA 7.RESULTADOS DEL ENSAYO PRELIMINAR SPIKE DE HIALURONATO DE SODIO

Replicas	DILUCIONES DE PRODUCTO									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	PRODUC TO PURO	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:140	Control negativo
1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)

En el desarrollo del ensayo SPIKE observamos que tanto para el producto puro como para sus diluciones seriadas realizadas no presenta inhibición ni interferencia que afecte la prueba debido a que se presentan resultados positivos en todos los casos hasta el MVD.

3.6 SELECCIÓN DE LA DILUCIÓN DE TRABAJO

Basándonos en el resultado obtenido en la prueba SPIKE tanto para la muestra concentrada, diluida y considerando el realce evidenciado en la prueba UNSPIKE, las diluciones a emplearse bajo estos términos son las que generen a partir de la dilución 1:32.

3.7 VALIDACIÓN DEL PRODUCTO

3.7.1 PRUEBA PRELIMINAR GEL-CLOT (1er Lote)

MUESTRA: ALURONIC Blispack Solución inyectable

LOTE: P1- 13801

DILUCIÓN DE TRABAJO: 1:32

SENSIBILIDAD DEL LAL (λ) = 0.25 UE/ml

TABLA 8. RESULTADO DE LA VALIDACIÓN DEL ALURONIC BLISPACK LOT. P1-13801

Replica	Concentración de Endotoxinas (EU/ml)					
	1EU/ml (4 λ)	0.5EU/ml (2 λ)	0.25EU/ml (1 λ)	0.125 (0.5 λ)	0.0625 (0.25 λ)	Control Negativo
1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
4	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

Se determinó el punto final de coagulación para cada réplica del lote P1- 13801 de ALURONICK Blispack.

TABLA 9. CÁLCULO DE LA MEDIA GEOMÉTRICA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DEL ALURONIC BLISPACK LOT. P1-13801

Muestras	PF (EU/ml)	Log PF
1	0.25	-0.602
2	0.25	-0.602
3	0.125	-0.903
4	0.25	-0.602
	Sumatoria	-2.709
	Promedio	-0.67725
	MG	0.21
	SD	0.0625

Se confirma la ausencia de endotoxinas en el producto mediante la formación de una coagulación en el fondo del tubo al girar 180°, determinando así que el producto se encuentra libre de pirógenos.

3.7.2 PRUEBA PRELIMINAR GEL-CLOT (2do Lote)

MUESTRA: ALURONIC Blispack Solución inyectable

LOTE: P1- 13802

DILUCIÓN DE TRABAJO: 1:32

SENSIBILIDAD DEL LAL (λ) = 0.25 UE/ml

TABLA 10. RESULTADO DE LA VALIDACIÓN DEL ALURONIC Blispack LOT. P1-13802

Replica	Concentración de Endotoxinas (EU/ml)					
	1 = 4 λ	2 λ = 0.5	λ = 0.25	0.5 λ =0.125	0.25 λ =0.0625	C N
1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

Se determinó el punto final de coagulación para cada replica para el lote P1- 13802 de ALURONICK Blispack indicándonos que no existe inhibición.

TABLA 11. CÁLCULO DE LA MEDIA GEOMETRICA Y DESVIACIÓN ESTANDAR DEL ALURONIC BLISPACK LOT. P1-13802

Muestras	PF (EU/ml)	Log PF
1	0.25	-0.602
2	0.25	-0.602
3	0.25	-0.602
4	0.25	-0.602
Sumatoria		-2.408
Promedio		-0.602
MG		0.25
SD		0

Se confirma la ausencia de endotoxinas en el producto mediante la formación de una coagulación en el fondo del tubo al girar 180°, determinando así que el producto se encuentra libre de pirógenos.

3.7.3 PRUEBA PRELIMINAR GEL-CLOT (3er Lote)

MUESTRA: ALURONIC Blispack Solución inyectable

LOTE: P1- 13803

DILUCIÓN DE TRABAJO: 1:32

SENSIBILIDAD DEL LAL (λ) = 0.25 UE/ml

TABLA 12. RESULTADO DE LA VALIDACIÓN DEL ALURONIC BLISPACK LOT. P1-13803

Replica	Concentración de Endotoxinas (EU/ml)					Control Negativo
	$4 \lambda = 1$	$2\lambda = 0.5$	$\lambda = 0.25$	$0.5 \lambda = 0.125$	$0.25 \lambda = 0.0625$	
1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
3	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
4	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

Se determinó el punto final de coagulación para cada replica para el lote P1- 13803 de ALURONICK Blispack indicándonos que no existe inhibición.

TABLA 13. CÁLCULO DE LA MEDIA GEOMÉTRICA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LAS MUESTRAS DE ALURONIC BLISPACK LOT. P1-13803

Muestras	PF (EU/ml)	Log PF
1	0.25	-0.602
2	0.25	-0.602
3	0.25	-0.602
4	0.25	-0.602
	Sumatoria	-2.408
	Promedio	-0.602
	MG	0.25
	SD	0

Se confirma la ausencia de endotoxinas en el producto mediante la no formación de una coagulación en el fondo del tubo al girar 180°, determinando así que el producto se encuentra libre de pirógenos. Se determina también la prueba de control negativo para este ensayo lo que nos indica que no hay inhibición por parte de la dilución del producto. Por medio de la media geométrica se puede observar que la prueba es no mayor a 0.5 EU/mL (2λ) y no menor a 0.125 EU/mL (0.5λ), por lo que se concluye que la dilución no posee factores interferentes en las condiciones experimentales.

La prueba de endotoxina bacteriana es válida debido a que la menor concentración de la solución estándar de endotoxina dio resultados negativos en todas sus réplicas.

3.8 ENSAYO DE RUTINA

ALURONIC Blispack

LOTE: P1- 13801

TABLA 14.RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE RUTINA DEL PRODUCTO A DILUCIÓN 1:32

ENSAYO	REPLICA	RESULTADO
producto	1	(-)
	2	(-)
control (+)	1	(+)
	2	(+)
control (-)	1	(-)
	2	(-)

TABLA 15.RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE RUTINA DEL PRODUCTO A DILUCIÓN 1:32.

ENSAYO	REPLICA	RESULTADO
producto	1	(-)
	2	(-)
control (+)	1	(+)
	2	(+)
control (-)	1	(-)
	2	(-)

TABLA 16.RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE RUTINA DEL PRODUCTO A DILUCIÓN 1:32.

ENSAYO	REPLICA	RESULTADO
producto	1	(-)
	2	(-)
control (+)	1	(+)
	2	(+)
control (-)	1	(-)
	2	(-)

En el ensayo de rutina del producto podemos observar que no existe gelificación, indicándonos que el producto está libre de endotoxinas.

En el control positivo podemos observar que los resultados nos indican que no existe inhibición por parte del producto y de acuerdo a los resultados los tubos del control negativo nos descarta alguna posible contaminación en el producto

CAPÍTULO IV

4 CONCLUSIONES.

1. Se realizó la validación de la técnica de endotoxinas bacterianas por el método GEL-CLOT de la prueba LAL en el inyectable intraarticular de Hialuronato de sodio, ALURONIC Blispack elaborado en laboratorios GINSBERG ECUADOR S.A concluyendo que la aplicación de este método en la determinación de pirógenos en soluciones inyectables es aplicable, seguro y confiable.
2. Mediante el análisis de determinación de endotoxinas bacterianas por el método GEL-CLOT de la prueba LAL se evidencia que solución inyectable de ALURONIC Blispack está libre de pirógenos y no representa amenaza alguna para los pacientes a los que van a ser administrados.
3. según la realización del ensayo de confirmación del rotulo que se ejecutó por cuadruplicado se pudo validar al analista y se logró establecer que la prueba LAL cumple con parámetros de calidad como son especificidad, precisión y repetitividad.
4. Se logró determinar mediante cálculos preliminares el máximo valor de dilución y de acuerdo a la adecuada selección de la sensibilidad del reactivo según el límite de endotoxinas nos permitió desarrollar una correcta ejecución de los ensayos propuestos para la validación del método LAL.
5. Se confirmó la sensibilidad del reactivo en el producto, esto mediante el cálculo de la media geométrica de los puntos finales (gelificación) de cada prueba en los diferentes lotes de ALURONIC Blispack.

6. El pH del producto estuvo dentro de especificaciones establecidas lo que nos permitió una eficiente realización de todos los ensayos correspondientes a la prueba por lo que no hubo la necesidad de regularlo.

7. Se logró demostrar que los diferentes lotes del producto utilizado en la validación no inhiben, ni potencian, ni interfieren con el ensayo, esto debido a los resultados obtenidos en las pruebas SPIKE y UNSPIKE realizadas en la validación de la prueba LAL.

CAPÍTULO IV

5 RECOMENDACIONES.

1. Se debe tener mucho cuidado en el momento de la reconstitución del reactivo LAL, se recomienda dejar en reposo alrededor de 10 minutos para total solubilidad del liofilizado.
2. Es recomendable tener todos los materiales y equipos listos para el desarrollo de la prueba como el baño maría que se la enciende con tiempo de anticipación, para evitar contra tiempos que puedan ocasionar resultados erróneos o falsos positivos.
3. Realizar una nueva validación en caso de cambios en las pruebas, procedimientos, ensayos o cambios de analista.
4. Se debe dejar constancia de los resultados finales de los procesos de validación a través de documentos formales que certifiquen a los mismos tales como el informe y el certificado de validación.
5. Es necesario utilizar el producto ALURONIC Blispacka temperatura ambiente y verificar que el pH del producto este dentro del rango normal para su aplicación de la prueba LAL, esto es necesario para que se desarrolle la cascada de coagulación.
6. Agitar los tubos de cada dilución seriada que se realice y se debe tener en stock suficientes puntas despirogenadas para micro pipetas.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, Richard. Farmacología y terapéutica. Zaragoza, España, Acribia.2010. pp.2040.

AGUILERA, Natalia y otros. El dilema de los estériles. Cali, Colombia 1999. pp. 34, 35

AGUDELO, C. Valoración de endotoxinas bacterianas en sueros antiofídicos de origen equino. (Tesis) (Msc. Biot). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias. Bogotá, Colombia.1999. pp.141

http://books.google.com.ec/books/about/Valoracion_de_endotoxinas_bacterianas_en.htm?id=f0JsHQAACAAJ&redir_esc=y

[2014-01-23]

ÁLPIZAR, Lourdes. Fisiopatología de la fiebre. (Revista Médica militar. Instituto superior de medicina militar "Dr. Luis Días Soto") Cuba. No 1, Vol. 9.28 de enero 1999.pp 49-51

ALDANA, Dy otros. Valoración de endotoxinas bacterianas en ranitidina y penicilina G sódica inyectable mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus*.(Tesis). (Biot. Amb). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de Microbiología.Bogotá, Colombia.2006. pp.11, 15 – 28

<http://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4943>

[2014-01-19]

ARIAS José.Manual de microbiología farmacéutica.México D. F. México.Ceja. 2005. pp. 32.

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE FARMACÉUTICOS DE LA INDUSTRIA AEFI.Validación de métodos analíticos.8^{ed}. Barcelona, España. AEFI.2001. pp. 24-25, 41, 77, 78.

ASSOCIATES OF CAPE COD INC.LAL methods and applications.Massachusetts, USA.COD INC. 1999. pp 12.

<http://www.acciusa.com/pdfs/catalogs/ACCCatalog.pdf>

[2014-01-25]

BURGUET, N y otros. Valoración de endotoxinas bacterianas en el inyectable ácido zoledrónico mediante la prueba de lisado del Amebocito de *Limulus*. (Artículo científico) (Revista Cubana de Farmacia) (Cuba) No. 46, Vol. 3. pp. 3-5. Julio- septiembre 2012.
http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol46_3_12/far05312.htm
[2014-01-20]

CALIDAD DE METODOS ANALITICOS

<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s15.htm>
[2014-01-14]

CAMARÓ, María y otros. Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos, España. ISBN. 2013 pp 345

CARO, Nataliay CRUZ Jehimy. Validación de las pruebas de esterilidad por la técnica de filtración por membrana y endotoxinas bacterianas por el método de LAL en tres productos farmacéuticos. (tesis), (Microbióloga Ind). Pontificia Universidad Javeriana, facultad de ciencias, carrera de microbióloga Industrial. Bogotá, Colombia. 2006. pp. 15, 16, 17.
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis272.pdf>
[2014-02-02]

CARRILLO, C y otros. Valoración de endotoxinas bacterianas enranitidina y penicilina g sódica inyectable mediante la prueba de lisado del amebocito de *Limulus*. (Tesis), (Biot Amb). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Bogotá, Colombia. 2006. pp. 15-28

COOPER John. Validation of Bacterial Endotoxins Test Methods. 6^{ta} Ed. USA.S,ed. 1999 .pp 67

CORTES, Natalia. 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) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de ciencias básicas. Bogotá D.C. Colombia. 2006. pp 16, 18.
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis272.pdf>
[2014-01-24]

CUESTA, Alicia. Protocolo de validación. USA. FAO. 2010. pp. 3, 4.
<http://www.slideshare.net/manfenix/validacion-de-mtodos-microbiolgicos-en-alimentos>
[2014-01-23]

DAWSON, M. Límites de Endotoxinas *LAL Update*, N. 13 -2. 1997. pp. 32

ENDOSAFE. U.S. License No.1197 endotoxinas, Certificado de calidad. USA.
ENDOSAFE. 2013

ESTRUCTURA QUÍMICA DEL HIALURONATO DE SODIO

<http://spanish.alibaba.com/product-gs/organic-sodium-hyaluronate-713449139.html>

[2014-01-23]

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DE ARGENTINA. Ensayos de esterilidad.7ª ed. Argentina. Farmacopea Argentina. 2003. pp. 48-50. 138.

<http://www.salutia.com.ar/sitio/sp/servicios/Vademecum/Farmacopea_Ar2003gentina/Drogas/sp_Vademecum_Farmacopea_Drogas_C.htm>

[2014-02-01]

FARMACIA ECUATORIANA.

http://emplea.universia.es/informacion/sectores_profesionales/industria_farmaceutica/

[2014-01-10]

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. USA. QLC. 1999. pp 243

GISBERG ECUADOR S.A. Documento reservado. Bibliografía interna. 2014.

GUIA DE VALIDACIÓN DE METODOS ANALITICOS

<http://www.ministeriodesalud.go.cr/empresas/protocolos/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>

[2014-01-26]

HARLEY, Jy KLEIN. Microbiología Prescott. México D. F.-México. S, ed. 2009. pp. 57-59.

<http://www.cosaslibres.com/search/pdf/microbiologia-prescott-8-edition/2>

[2014-01-26]

HIALURONATO DE SODIO

<http://www.socreum.sld.cu/farmacos/hialuronato.htm>

[2014-01-22]

INDUSTRIA FARMACÉUTICA.

<http://www.telegrafo.com.ec/economia/item/la-industria-farmaceutica-mejora-su-tecnolmantiene-su-crecimiento.html>

[2014-01-10]

JERINGA PRELENA

<http://www.softigel.com/Plataformas-Tecnologicas/Esteriles.aspx?lang=es-CO>

[2014-02-05]

MECANISMO DE ACCION.

<http://www.limpiezafacial.net/%C2%BFpara-que-se-utiliza-el-hialuronato-de-sodio/>

[2014-01-24]

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA DEL ECUADOR. Reglamento de Buenas Prácticas de Manufactura de la industria farmacéutica. Resolución No 93. 2002 COMIECO. pp. 197

http://portal.mspas.gob.gt/images/files//MarcoLegal/Medicamentos/AC_506_2002.pdf

[2014-02-01.]

MOROTE Maria, y otros. Validación de la Técnica LAL (GEL CLOT) en los Agentes de Radiodiagnóstico y Radioisótopos. Argentina. 2002. pp. 67

<http://www.alasbimnjournal.cl/revistas/16/secb/0,1990,SCID%253D1497,00.html>

[2014-01-21]

OSORIO, C. Validación de endotoxinas bacterianas (LAL) por el método GEL-CLOT en furosemida (20 mg) inyectable. (tesis), (Lcda. Quim y Far) Universidad del Salvador, facultad de química y farmacia, Escuela de química y farmacia. El Salvador. 2011 pp.71-75. 80-83.

[http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n de la prueba de endotoxina bacteriana %28LAL%29 por el m%C3%A9todo Gel-Clot utilizando el produ.pdf](http://ri.ues.edu.sv/2457/1/Validaci%C3%B3n%20de%20la%20prueba%20de%20endotoxina%20bacteriana%20por%20el%20m%C3%A9todo%20Gel-Clot%20utilizando%20el%20produ.pdf)

[2014-01-24]

PERDOMO MORALES, Rolando. Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL). (Revista Cubana de farmacia). Cuba. N. 38, Vol. 1. pp 38. Julio 2004

PRESCOTT L, HARLEY J, KLEIN D. *Microbiología* 4. España. Mc Graw Hill Interamericana. 1999. pp.45, 46

RAMÍREZ J. y otros. Metodología para la validación de análisis de medicamentos y cálculos estadísticos. (Revista seminario taller). El Salvador. N. 45, Vol 3. pp. 23. 24 agosto 2010.

<http://www.ugr.es/~aepc/VIIIFORO/LibrocapitulosVIIIfecies>

[2014-01-27]

ROSALES, I y POURTOU, R. Validación de metodos analiticos empleados en el control de calidad de productos biotecnologicos. (Revista colombiana de Biotecnologia). (Colombia). No. 4, Vol 1. pp 73. Noviembre 1998

SALAS, M. Validación de la Prueba deEndotoxina bacterianaspor la técnica de *Limulus ameobocyte lysate* LAL Método de gel Clot. (Revista Curso teórico Práctico HYPATIAS.A.)(Colombia) No. 4, Vol 1. Lima. 2001. Pp.1. 17 de noviembre del 2006

SKOOG, Douglas y otros. Fundamentos de química analítica. México. Thomson. 2005. pp. 342-345

http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/jrvc/QA_1/Manual_de_Practicas_de_Quimica_Analitica.pdf

[2014-01-27]

SOLÍAsencio.Validación de la prueba de endotoxina bacteriana por el método LAL (*Lymulus ameobocyte lysate*) por el método de Gel Clot en clindamicina 600 mg inyectable. (tesis)(Quím Farm). Universidad Mayor de San Marcos, Facultad de ciencias.Lima, Perú. 2004. pp23.

http://dspace.icesi.edu.co/dspace/bitstream/item/236/1/naguilera-jcalero-jgiraldo-fgomez_dilema-esteriles.pdf

[2014-01-25]

SOLIS, Jenny., Validación de la prueba de endotoxinas bacterianas LAL (*limulus ameobocyte lysate*) por el método Gel Clot en Clindamicina 600mg inyectable. (tesis) () Lcda. Bioq y Farm).Universidad Nacional Mayor de San Marcos, facultad de farmacia y bioquímica.Lima, Peru. 2004. pp.25-27. 35

TORRES, Aly otros. Validation of two analytical methods applied to two new cytostatic drugs. Bonn.STP. 1999. pp. 93-99

<http://hdl.handle.net/123456789/1584>

[2014-02-23]

Convención farmacopea de los Estados Unidos, USP. Validación de métodos. ed 35 NF- 30. USA. 2012. pp. 216

Convención farmacopea de los Estados Unidos, USP. Endotoxinas Bacterianas. ed 35 NF- 30. USA. 2012. pp. 2169-2173

Convención farmacopea de los Estados Unidos, USP. Inyectables. ed 35 NF- 30. USA. 2012. pp. 21

Convención farmacopea de los Estados Unidos, USP. Prueba de endotoxina bacteriana. ed 35 NF- 30. USA. 2012. pp. 173

VALIDACIÓN DE PROCESOS,

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Lecturavalidacion-4_15038.pdf
[2014-02-01]

VALIDACION DE METODOS ANALITICOS.

<http://www.catlab.com.ar/notas.php?idm=1408&accion1=notas&PHPSESSID=f1b21309ce5408096e5d4b326c93398d>
[2014-01-19]

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

www.who.int/medicines/publications/pharmprep/en
[2014-01-23]

VALIDACIÓN CONCURRENTE.

http://www.ehowenespanol.com/tipos-validacion-procesos-lista_314177/
[2014-02-11]

WALKER Stuart. Microbiología. México D.F, México. MacGraw-Hill. 1998. pp. 9-23.

ANEXOS

ANEXO 1. REPORTE DE ANALISIS TOC FUSION - AGUA GRADO INYECTABLES.

Fusion Report - ANALISIS RUTINARIO AGUA GINSBERG jueves, 14 de noviembre de 2013 11:15	(View - Repts, Unused Repts, Meta-Data, Signature, History) Printed on 2013/11/14 16:01 - jueves
---	---

Report Summary Information

Company Location:	GINSBERG		
Schedule Name:	ANALISIS RUTINARIO AGUA GINSBERG	Engine Version:	1.1.0.192
Instrument Name:	TOC FUSION	Firmware Version:	1.2.0696
Report Version:	1 of 1	Connection:	RS232 COM1
Report Creation by Operators (schedule version):	Paulina Cruz (Paulina) (v112)		
Comment:			

Report Results

Sample Type: Sample							From Schedule Version 112		
Pos	Analysis Type	Sample ID	Result (ppmC)	Std. Dev. (ppmC)	RSD	Start Time			
♦ 15	TOC	D3 - LAVADO Y ESTERILIZACION (OLSA)	0.3263 ppm	0.0022 ppm	0.6800%	2013/11/14 12:07			
Rep #	Base Analysis Type	ppm	µg	Adjusted (Abs)	NDIR (Abs)	Baseline (Abs)	Pressure (psig)	Run Time	
1	TOC	0.3247	2.9223	22.25	28.08	5.83	52.01	03:36	
2	TOC	0.3278	2.9505	22.44	27.68	5.24	52.65	03:36	
<u>Dilution</u>		<u>Blank Contribution</u>		<u>Method</u>		<u>Calibration</u>			
1:1		2.3390 (v743)		método Ginsberg low speed (v1)		20121002 Vivi training (v12)			

ANEXO 2: VALORES DE CONDUCTIVIDAD Y pH COMO FUNCIÓN DE TEMPERATURA EN DIFERENTES ETAPAS CONSIDERADAS.

Etapa 1—Requisitos de Temperatura y Conductividad
(sólo para medidas de conductividad sin compensar por temperatura)

Temperatura	Requisito de Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)
0	0,6
5	0,8
10	0,9
15	1,0
20	1,1
25	1,3
30	1,4
35	1,5
40	1,7
45	1,8
50	1,9
55	2,1
60	2,2
65	2,4
70	2,5
75	2,7
80	2,7
85	2,7
90	2,7
95	2,9
100	3,1

Etapa 3—Requisitos de pH y Conductividad
(sólo para muestras equilibradas con temperatura y atmósfera)

pH	Requisito de Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)
5,0	4,7
5,1	4,1
5,2	3,6
5,3	3,3
5,4	3,0
5,5	2,8
5,6	2,6
5,7	2,5
5,8	2,4
5,9	2,4
6,0	2,4
6,1	2,4
6,2	2,5
6,3	2,4
6,4	2,3
6,5	2,2
6,6	2,1
6,7	2,6
6,8	3,1
6,9	3,8
7,0	4,6

ANEXO 3. FORMATO DE ANÁLISIS DE PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

CERTIFICADO DE ANÁLISIS
ENSAYO DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS: LAL

Nº. REPORTE:	ED – 115	MÉTODO:	LAL
CASA:	Sionpharm	FECHA ENVASE:	12/12/2013
PRODUCTO:	Aluronic Blispack	FECHA ESTERILIZACIÓN:	12/12/2013
PRESENTACIÓN:	Jeringa prellena x 2.5 mL	FECHA ANÁLISIS:	12/12/2013
CARGA ESTERILIZ.	-		
LOTE:	13737	MATERIA PRIMA:	
		ESTABILIDAD	
DILUCIÓN ENSAYO:	1:32	PROD. TERMINADO	X

DATOS REACTIVOS

ENDOTOXINA ESTANDAR	REACTIVO LAL	AGUA LAL
Proveedor: Endosafe	Proveedor: Endosafe	Proveedor: Endosafe
Lote: EM21152	Lote: E4321L	Lote: 99732158
Concentración: 1000 UE/MI	Sensibilidad: 0.25 UE/mL	Expira: 07/2014
Expira: 05/2016	Expira: 08/2016	
Fecha reconstitución: 26/07/2013	Fecha reconstitución: 02/10/2013	

RESULTADOS

MUESTRA	CONTROL NEGATIVO (Diluyente)	CONTROL POSITIVO (Diluyente)	CONTROL POSITIVO (Muestra)	CONCENT. ENDOTOX. Control positivo (EU/ml)
	-	+	-	0.25 UE/mL

NOTA: (+) = Formación de gel
(-) = Sin formación de gel

OBSERVACIONES:

RESULTADO FINAL: CUMPLE: X
NO CUMPLE:

CUADERNO: Áreas Estériles

ANALIZADO POR: _____ REVISADO POR: _____ FECHA: ___/___/___ pág.:

ANEXO 4. MODELO DE CERTIFICADO DE PRUEBA LAL.

ASEGURAMIENTO DE CALIDAD			
CERTIFICADO DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO			
PRODUCTO:			
ETAPA:			
LOTE N°:			
ENSAYO	ESPECIFICACIONES	REFERENCIA	RESULTADOS
PRUEBA DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS LAL	En la técnica de GET –CLOT transcurrido 60minutos de in cubación en el baño María a 37°C al invertir los tubos, se confirma la ausencia (-) de un coágulo	USP 31 <85>	CUMPLE
OBSERVACIONES:			

Fecha análisis microbiológico:		Disposición:	
Realizado por: _____			
Analista de Microbiología			
Revisado por: _____			
Jefe de Control de Calidad			

ANEXO 5. FORMATO DE UN PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE PROCESO

<p>Protocolo de validación _____ Validación del proceso _____ pág. _ de ____ Título _____ Nombre y dirección del establecimiento _____ Protocolo de validación N° _____ Validación del proceso _____ Título: _____ Protocolo redactado por: _____ Aprobado por: _____ Fecha: _____ Aprobación de Aseguramiento de Calidad por: _____ Fecha: _____</p>
<p>Objetivo:</p> <p>Alcance:</p> <p>Responsabilidad:</p>
<p>1. Descripción del proceso en su totalidad: subprocesos, diagrama de flujo, pasos críticos/riesgos</p> <p>- Formula Patrón:</p> <p>- Listado de POES:</p> <p>POS para las operaciones normales del proceso (utilizados para la fabricación y limpieza y sanitización) sometido a prueba (incluidos los formularios para el registro de datos y los materiales y equipos necesarios).</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>POS para las pruebas durante la fabricación, de control de calidad efectuadas durante el proceso (pruebas validadas) (incluidos los formularios para el registro de datos y los materiales y equipos necesarios).</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>POS para las pruebas específicas del estudio de validación que se efectúa (pruebas validadas) (incluidos los formularios para el registro de datos y los materiales y equipos necesarios).</p> <p>_____</p> <p>_____</p>

2. Descripción de los sistemas, equipos e instrumentos involucrados, con sus calificaciones, mantenencias y calibraciones correspondientes.

Listado sistemas/equipos/aparatos/instrumentos	Informe PQ/mantenición/calibración (señalando fecha)	Aceptado/rechazado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

3. Identificación de la validación de las metodologías analíticas.

Listado	Informe validación	Aceptado/rechazado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

4. Capacitación del personal.

5. Detalles de descripción de: parámetros a controlar, plan de muestreo, frecuencia de controles, métodos de control, criterio de aceptación y análisis de riesgos identificando los parámetros críticos, entre otros.

6. Procedimiento

Funcionamiento

Proceso: Ejecutar tres veces el proceso completo de acuerdo a los POES y registrar todos los datos necesarios.

Las desviaciones de los procedimientos se registrarán en los formularios para el registro de datos.

Pruebas analíticas: efectuar las pruebas ordinarias asociadas con el proceso, en conformidad con el POS. Los resultados de las pruebas tendrán que ser aprobados por Control de Calidad.

Evaluación

Anexar todos los formularios para el registro de datos y los gráficos.

Efectuar todos los cálculos y análisis estadísticos (determinados con anterioridad) necesarios.

Comparar con los criterios de aceptación.

Preparar el informe de desviaciones.

(Incluyendo la justificación de la aceptación y la repercusión sobre el proceso).

Preparar un informe de validación del proceso

Éste debe incluir para cada ciclo de validación lo siguiente: fecha de inicio del estudio; fecha de finalización; observaciones efectuadas; problemas encontrados; integridad de la información recogida; resumen del informe de desviaciones de las pruebas; y los análisis estadísticos; concordancia de los resultados con los criterios de aceptación; ubicación de los datos originales; otra información pertinente al estudio.

Aprobación

Presentar el documento a Aseguramiento de Calidad para su examen y aprobación.

El proceso debe cumplir todas las especificaciones en tres ciclos consecutivos

7. Listado de los formularios para el registro de datos que se adjuntan

Verificado por: _____ Fecha: _____

8. Cálculos y análisis estadísticos

Efectuado por: _____ Fecha: _____

Verificado por: _____ Fecha: _____

9. Criterios de aceptación comparados con los resultados de la prueba

Criterios	Resultados	Aprobado/rechazado
_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

Redactado por: _____ Fecha: _____

Verificado por: _____ Fecha: _____

10. Informe de desviaciones

Desviaciones:

Justificación de la aceptación:

Impacto sobre el proceso:

Redactado por: _____ Fecha: _____

Verificado por: _____ Fecha: _____

11. Informe de validación del proceso

Resultados:

Conclusión:

Redactado por: _____ Fecha _____

Aprobación de Aseguramiento de Calidad por: _____ Fecha _____

**ANEXO 6. PARAMETROS DE CALIDAD DEL PRODUCTO COMERCIAL
ALURONIC BLISPACK.**

Jefe de Control de Calidad

De: Gerencia [gcomercial@sng.com.ec]
 Enviado el: miércoles, 13 de noviembre de 2013 17:04
 Para: jcontrol@sng.com.ec
 Asunto: Re: Aluronic Blispack

Parámetros	Especificaciones	Resultados
ASPECTO	Solución inyectable transparente, libre de partículas.	Cumple
IDENTIFICACION	Positivo	Cumple
VOLUMEN PROMEDIO	Mayor o igual a 2,5 ml	2,6 ml
pH	5,5 – 8,5	7,18
DENSIDAD	0,9 – 1,3 g/ml	1,1 g/ml
HIALURONATO DE SODIO	9,0 mg – 11,0 mg /ml	10,06 mg/ml
ENDOTOXINAS BACTERIANAS	No más que 0,5 UI/ mg de Hialuronato de sodio	Cumple
ESTERILIDAD	Pasa la prueba de Esterilidad	Cumple

De: Jefe de Control de Calidad <jcontrol@sng.com.ec>
 Organización: SNG
 Responder a: <jcontrol@sng.com.ec>
 Fecha: Wed, 13 Nov 2013 16:47:51 -0500
 Para: Marco Serrano <gcomercial@sng.com.ec>
 Asunto: Aluronic Blispack

**ANEXO 7. IDENTIFICACION DEL PRODUCTO: ALURONICK BLISPACK
ELABORADO.**

ginsberg IDENTIFICACIÓN DEL PRODUCTO

PRODUCTO: Aluronic Blispack CASA: Sionphur

PRESENTACIÓN: Uso inj

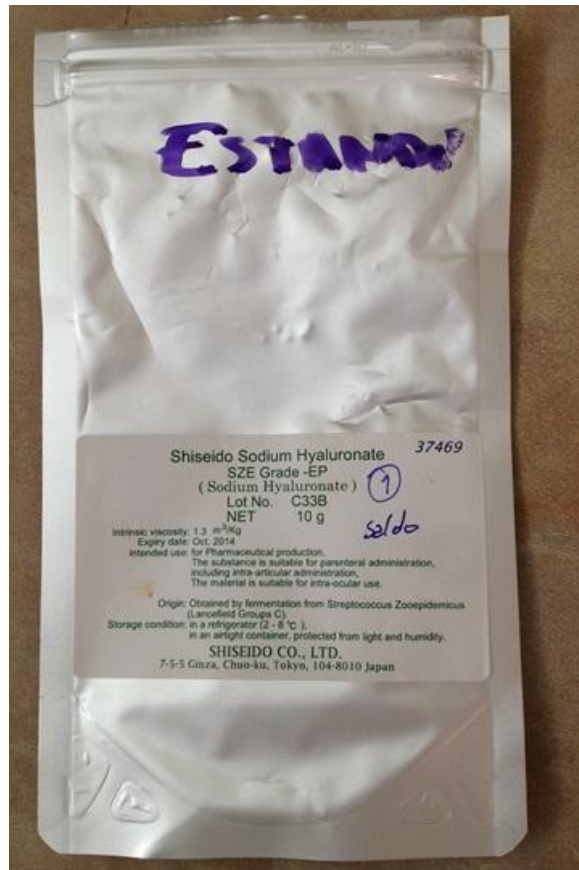
LOTE: 13802 N° ORDEN: _____

PROCESO: Control Visual

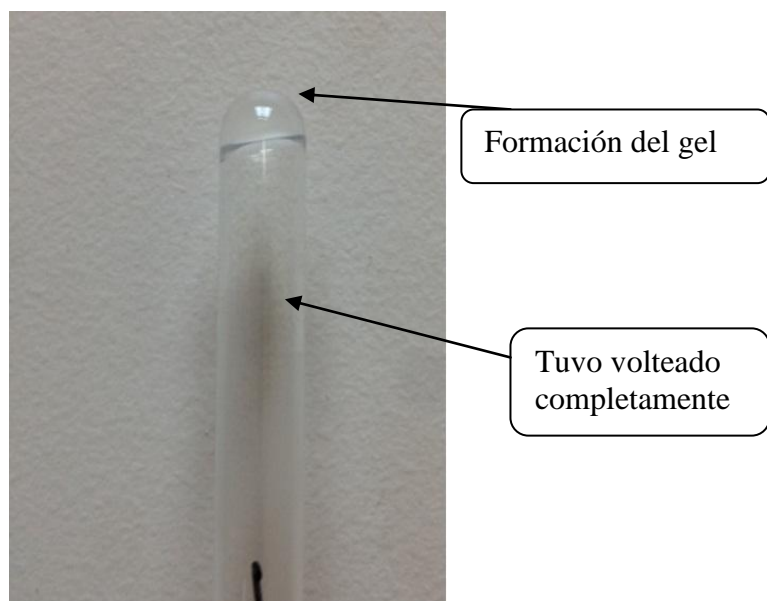
CANTIDAD: 100 N° RECIPIENTES: 1

RESPONSABLE: HO FECHA: 13-11-2013

ANEXO 8. ESTANDAR SECUNDARIO PARA HIAURONATO DE SODIO.



ANEXO 9. FORMACION DEL GEL POR COAGULACION.



ANEXO 10. INCUBACION DE LOS TUBOS EN LA PRUEBA DE GELIFICACION.



Incubación
a 37°C

ANEXO 11. DESARROLLO DEL ENSAYO LAL.



ANEXO 12. LECTURA DE LOS TUBOS LUEGO DE LA INCUBACION.

