



**Somos calidad,
somos USC**

**Evaluación de la presencia de factores de interferencia en agua estéril para inyección
mediante la técnica Gel-Clot en Laboratorios EDO S.A.S**

Autor

**Adriana Marcela Naranjo Chamorro
Andrea Velez Salazar**

**Título por el que opta
Microbióloga**

Director

**Carlos Andres Martinez Garay
Yimy W. Cruz Bolaños**

**Grupo de Investigación
Grupo de Investigación en Micología GIM**

**Línea de Investigación
Biotecnología y bioprocesos**

**Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Microbiología
Universidad Santiago de Cali
Santiago de Cali - Colombia
2025**

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Optimización de controles de calidad, reducción de costos por falsos positivos/negativos.	Laboratorios EDO S.A.S., industria farmacéutica.
Responsabilidad social	Garantía de inocuidad en productos inyectables para uso veterinario, reduciendo riesgos en salud.	Usuarios finales (pacientes animales), comunidad veterinaria.
Científico	Evaluación de interferentes del método <i>Gel-Clot</i> en agua estéril bajo condiciones locales; generación de nuevo conocimiento.	Comunidad académica y científica en microbiología y control de calidad.
Indicadores de Gestión	Protocolos estandarizados para pruebas de endotoxinas según Farmacopea de los Estados Unidos (USP) capítulo <85>[1].	Laboratorios EDO S.A.S., entes reguladores (ICA).
Tecnológico	Implementación de técnica estandarizada de detección de endotoxinas con control de interferencias.	Laboratorios EDO S.A.S.
Técnico	Desarrollo de procedimientos experimentales reproducibles para control rutinario.	Técnicos y profesionales de calidad en la industria farmacéutica.
Ambiental	Uso racional de insumos y reactivos apirógenos, reducción de desechos contaminados y mejora del impacto ambiental asociado al cangrejo herradura utilizado en la obtención del reactivo LAL (Lisado de Amebocito de <i>Limulus</i>).	Medio ambiente, ecosistemas marinos, industria farmacéutica sostenible.
Social	Contribución a la seguridad sanitaria y confianza en productos farmacéuticos veterinarios.	Sociedad en general (propietarios y animales).
Cultural	Apropiación social del conocimiento científico en torno a la bioseguridad y calidad farmacéutica.	Comunidad universitaria y sector salud.

EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE FACTORES DE INTERFERENCIA EN AGUA ESTÉRIL PARA INYECCIÓN MEDIANTE LA TÉCNICA GEL-CLOT EN LABORATORIOS EDO S.A.S

Adriana Marcela Naranjo Chamorro¹, Andrea Velez Salazar².

¹Adriana Marcela Naranjo Chamorro, adriana.naranjo00@usc.edu.co; ²Andrea Velez Salazar, andrea.velez02@usc.edu.co; Grupo de Investigación en Micología GIM de la Universidad Santiago de Cali. Facultad de Ciencias Básicas. Universidad Santiago de Cali. Campus Pampalinda Calle 5 # 62-00. Santiago de Cali. Colombia

RESUMEN

La seguridad microbiológica de los productos parenterales es fundamental para garantizar su inocuidad, debido a que las endotoxinas bacterianas representan un riesgo crítico para la salud. Estas toxinas, componentes de la membrana externa de bacterias Gram negativas, pueden causar fiebre, shock séptico o la muerte, y no siempre son eliminadas por procesos de esterilización convencionales. Con el fin de verificar la calidad del insumo “Agua Estéril para Inyección” producido por Laboratorios EDO S.A.S., se evaluó la presencia de posibles factores de interferencia en la detección de endotoxinas mediante la técnica Gel-Clot descrita en la USP <85>, utilizando reactivo LAL y controles positivos y negativos. Los resultados demostraron ausencia de endotoxinas y confirmaron que no existieron efectos inhibitorios ni potenciadores que afectaran la sensibilidad del ensayo. Se concluye que el agua analizada cumple con las especificaciones farmacopéicas y es apta para la fabricación de medicamentos estériles, respaldando las buenas prácticas de manufactura.

Palabras clave: Endotoxinas, Gel-Clot, factores de interferencia, agua estéril, lipopolisacáridos.

EVALUATION OF THE PRESENCE OF INTERFERING FACTORS IN STERILE WATER FOR INJECTION USING THE GEL-CLOT TECHNIQUE AT LABORATORIOS EDO S.A.S.

ABSTRACT

The microbiological safety of parenteral products is essential to ensure their safety, as bacterial endotoxins pose a critical health risk. These toxins, components of the outer membrane of Gram-negative bacteria, can cause fever, septic shock, or death, and are not always eliminated by conventional sterilization processes. In order to verify the quality of the “Sterile Water for Injection” produced by Laboratorios EDO S.A.S., the presence of possible interference factors in the detection of endotoxins was evaluated using the Gel-Clot technique described in USP <85>, using LAL reagent and positive and negative controls. The results demonstrated the absence of endotoxins and confirmed that there were no inhibitory or enhancing effects that affected the sensitivity of the assay. It is concluded that the analyzed water complies with pharmacopoeial specifications and is suitable for the manufacture of sterile drugs, supporting good manufacturing practices.

Keywords: *Endotoxins, Gel-Clot, interference factors, sterile water, lipopolysaccharides.*

1. INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica veterinaria enfrenta desafíos críticos en el aseguramiento de la calidad y seguridad de sus productos parenterales, particularmente en la detección de endotoxinas bacterianas. Las endotoxinas, también conocidas como lipopolisacáridos (LPS), son componentes estructurales de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que representan una amenaza significativa para la salud animal, ya que pueden desencadenar respuestas pirogénicas graves, shock séptico e incluso la muerte [2], [3], aun cuando el producto esté libre de microorganismos viables. Aunque los procesos de esterilización eliminan eficazmente las bacterias, los fragmentos de endotoxinas liberados permanecen estables y conservan su actividad biológica, haciendo que la detección de endotoxinas sea un requisito fundamental en la fabricación de productos farmacéuticos estériles [1], [4].

La relevancia de este control no es únicamente teórica; existen antecedentes documentados que ilustran las consecuencias del uso de insumos contaminados. En 1996, dos incidentes separados en Brasil causaron la muerte de 35 recién nacidos y 33 lactantes, luego de que se utilizara agua destilada contaminada con endotoxinas para la dilución de medicamentos intravenosos [5]. Aunque este evento se registró en pacientes humanos y no existen reportes similares en animales, evidencia de forma contundente que la presencia de endotoxinas en matrices destinadas a uso parenteral constituye un riesgo crítico que puede comprometer la vida. Esta situación subraya la importancia de implementar métodos confiables para su detección y control, incluso en matrices aparentemente simples como el agua estéril para inyección.

El agua estéril para inyección constituye un componente crítico en la producción farmacéutica, sirviendo como vehículo o diluyente para numerosos medicamentos parenterales [3], [4], [6]. Las normativas internacionales, como la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) [1] y las regulaciones nacionales del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) [7], establecen límites específicos para la concentración de endotoxinas en estos productos, que varían según su aplicación clínica: 0.5UE/mL para dispositivos en contacto con el sistema cardiovascular, 0.06UE/mL para contacto con líquido cefalorraquídeo, y límites aún más restrictivos para aplicaciones intraoculares [8], [9]. La técnica de coagulación *Gel-Clot*, basada en el lisado de amebocitos del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus*) [10], ha sido establecida como el método de referencia para la detección de endotoxinas bacterianas desde la década de 1970. Este método semicuantitativo aprovecha la capacidad de las endotoxinas para activar una cascada enzimática en los amebocitos de la sangre del cangrejo herradura [10], que produce la formación de un coágulo visible, permitiendo la detección de concentraciones tan bajas como 0.01-0.03 UE/mL [1], [4], [8]. Su robustez y reproducibilidad lo han posicionado como el "*gold standard*" [8] en las farmacopeas internacionales, manteniendo su relevancia frente a métodos alternativos más recientes como las técnicas cromogénicas y turbidimétricas.

Sin embargo, la aplicación efectiva de la técnica *Gel-Clot* enfrenta desafíos significativos relacionados con la presencia de factores de interferencia en las muestras. Estos factores pueden causar inhibición de la reacción, generando falsos negativos que comprometen la seguridad del producto, o la potenciación de ésta, dando lugar a falsos positivos que conllevan a rechazos innecesarios del producto. La naturaleza de estos factores de interferencia es diversa e incluye variaciones de pH, presencia de cationes divalentes, conservantes, excipientes, emulsionantes, y condiciones específicas de procesamiento y almacenamiento. La literatura científica ha documentado extensamente la importancia de la validación de métodos para la detección de endotoxinas. Estudios previos han demostrado la efectividad del método *Gel-Clot* en diversos productos farmacéuticos, como la validación realizada para la heparina sódica [4], donde no se encontraron interferencias significativas con la reacción del reactivo LAL (Lisado de Amebocito *Limulus*). De manera similar, investigaciones recientes han confirmado la aplicabilidad del método en soluciones estériles complejas, como dextrosa al 5% en solución salina al 0,9% [3], manteniendo resultados dentro de los límites de sensibilidad establecidos por la USP.

No obstante, existe una brecha significativa en el conocimiento específico sobre los factores de interferencia en agua estéril para inyección en el contexto de la industria farmacéutica veterinaria colombiana. La ausencia de protocolos estandarizados adaptados a las condiciones específicas de producción y la falta de estudios que evalúen sistemáticamente estos factores en matrices acuosas simples representan limitaciones importantes para el aseguramiento de la calidad. Esta situación es particularmente relevante considerando que el agua estéril para inyección, por su naturaleza aparentemente simple, puede presentar interferencias sutiles pero significativas que comprometan la detección precisa de endotoxinas.

La normativa vigente, específicamente la Resolución 62542 de 2020 del ICA sobre el Registro de Medicamentos de Uso Veterinario [7] y el capítulo general <85> de la USP [1], exige la realización obligatoria de pruebas de factores de interferencia cuando una muestra se somete al ensayo *Gel-Clot*. Esta exigencia regulatoria subraya la importancia crítica de establecer protocolos validados que garanticen la confiabilidad de los resultados analíticos. Para Laboratorios EDO S.A.S., la implementación de un protocolo robusto para la evaluación de factores de interferencia en su agua estéril para inyección representa no solo un cumplimiento regulatorio, sino también una oportunidad para fortalecer su sistema de calidad y posicionarse como líder en la industria farmacéutica veterinaria. La capacidad de demostrar que sus productos están libres de interferencias que puedan comprometer la detección de endotoxinas constituye un valor agregado significativo en términos de seguridad y confiabilidad.

Por estas razones, la presente investigación tiene como objetivo principal determinar la capacidad de inhibición o potenciación de la reacción en la coagulación del reactivo LAL que posee el agua estéril para inyección producida en Laboratorios Edo S.A.S. cuando se utiliza la técnica de coagulación *Gel-Clot* descrita en el capítulo <85> de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) [1]. Específicamente, se busca establecer los parámetros necesarios para el análisis de esta matriz bajo condiciones asépticas, verificar que las concentraciones en el punto final se encuentren dentro de los límites aceptables según la normativa vigente, y determinar el límite máximo de dilución que permita la detección precisa de endotoxinas bacterianas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló con un enfoque analítico-experimental, siguiendo los lineamientos establecidos en el capítulo <85> prueba de endotoxinas bacterianas de la (USP vigente) Farmacopea de los Estados Unidos [1]. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la presencia de factores de interferencia en agua estéril para inyección (WFI, *Water for Injection*) producida por Laboratorios EDO S.A.S., mediante la técnica de coagulación *Gel-Clot*.

Los insumos y equipos empleados fueron de grado apirógeno y certificados para pruebas de endotoxinas. Entre ellos se incluyeron: reactivo LAL (*Lisado de Amebocitos de Limulus polyphemus*, sensibilidad 0,25 UE/mL), estándar de endotoxinas de *Escherichia coli* O55:B5 (USP CSE), agua apirógena certificada, tubos apirógenos para reacción *Gel-Clot*; los anteriores insumos pertenecen al fabricante *Charles River Laboratories* situado en la Planta de soluciones microbianas: Charleston, Carolina del Sur. Micropipetas (100–1000 μL y 20–200 μL) (BRAND) con puntas estériles, baño maría (37 ± 1 °C), vortex (DLAB), y nevera para almacenamiento de reactivos reconstituidos.

2.1 METODOLOGÍA

2.1.1 Preparación de la matriz de estudio

La matriz de estudio corresponde al agua estéril fabricado por la empresa EDO S.A.S, bajo el documento POE-PQ032 SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE AGUA.

2.1.2 Preparación del estándar de endotoxina

Conociendo que la sensibilidad del reactivo LAL (*lisado de amebocitos de Limulus*) [10] corresponde a 0,25 UE/mL se define que ($\lambda = 0,25$ UE/mL). A partir de la potencia del estándar de endotoxina de 2000 UE/mL se prepararon cuatro diluciones de endotoxinas que correspondan a: 2λ (0,5 UE/ml), 1λ (0,25 UE/mL), $\frac{1}{2}\lambda$ (0,125 UE/ml) y $\frac{1}{4}\lambda$ (0,0625 UE/ml), los cálculos utilizados para la preparación de dichas diluciones se presentan en el apartado de anexos. donde λ corresponde a la sensibilidad marcada en la técnica *Gel-Clot* (EU/mL) o la concentración más baja utilizada en la curva estándar para la técnica turbidimétrica o la técnica cromogénica [1], utilizando el control estándar de endotoxinas (CSE) de *Escherichia coli* O55:B5 y agua apirógena certificada. Cada dilución se preparó por duplicado bajo condiciones asépticas.

2.1.3 Confirmación de la sensibilidad del lisado

En esta prueba, el parámetro de referencia correspondió a la verificación de la estabilidad en la sensibilidad del reactivo LAL. (Capacidad de detectar una concentración de endotoxina de 0,25 UE/ml) antes de usarlo en las muestras [1].

2.1.3.1 Procedimiento

Se adicionaron a un tubo 100 µL de cada dilución preparada con el control estándar de endotoxinas (2λ, 1λ, ½λ y ¼λ y 100 µL de reactivo LAL en tubos apirógenos, este proceso se realizó por duplicado para cada dilución. Los tubos se incubaron en el baño María a 37 °C ± 1 °C durante 1 hora. Pasado el tiempo se procedió a la lectura de las muestras, donde cada tubo fue invertido cuidadosamente y con un solo movimiento a un ángulo de 180°. Se observa un gel uniforme y bien coagulado en las diluciones iguales o mayores a la sensibilidad del reactivo de LAL (2λ, 1λ); los tubos que contenían las diluciones menores a la reportada en el reactivo de LAL como (½λ y ¼λ) permanecieron líquidas. Finalmente, se calculó la media geométrica del punto final, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Media geométrica del punto final} = \text{anti log log} \left(\frac{\sum e}{f} \right)$$

Donde:

Σe es la suma de las concentraciones logarítmicas del punto final de la serie de diluciones utilizadas.
f es el número de tubos de ensayo replicados.

La concentración media geométrica del punto final es la sensibilidad medida del lisado LAL expresada en (UE/ml).

2.1.4 Controles positivos y negativos

Una vez confirmada la sensibilidad, se procedió al montaje de los controles negativos y positivos los cuales se realizaron por duplicado para cada lote de agua de calidad inyectable que se. Cada control se llevó a cabo de la siguiente manera:

Control negativo:

- Se adicionaron 100 µL de agua apirógena certificada y 100 µL de Reactivo de LAL (0.25 UE / mL) en un tubo apirógeno.
- Las muestras fueron llevadas al baño maría a 37 °C +/1 °C durante un periodo de 1 hora.
- Pasado el tiempo se realizó la lectura de las muestras, cada tubo se invierte cuidadosamente con un solo movimiento a un ángulo de 180°, y se identificó que la muestra no presenta gelificación alguna.

Control positivo:

- Se adicionaron 100 µL de control estándar de endotoxinas a una concentración de 0,5 UE/mL y 100 µL de Reactivo de LAL (0.25 UE / mL) en un tubo apirógeno.
- Las muestras fueron llevadas al baño maría a 37 °C +/1 °C durante un periodo de 1 hora.
- Pasado el tiempo se realizó la lectura de las muestras, cada tubo se invierte cuidadosamente con un solo movimiento a un ángulo de 180°, y se identificó que la muestra presenta gelificación.

2.1.5. Evaluación de la muestra sin endotoxinas

Una vez fueron realizadas las anteriores pruebas, se procedió al montaje de los tres lotes de agua estéril para inyección, cada lote evaluado consistió de 4 réplicas correspondientes a la prueba denominada “prueba con producto sin endotoxinas”, la cual consiste en la evaluación de la muestra de agua estéril para inyección frente al Reactivo de LAL; durante este proceso se generaron un total de 12 pruebas para los tres lotes evaluados.

- Se tomaron 100 µL del primer lote de agua estéril para inyección, se depositaron en un tubo apirógeno, y se adicionaron 100 µL de reactivo de LAL.

- Las muestras fueron llevadas al baño maría a 37 °C +/-1 °C durante un periodo de 1 hora.
- Pasado el tiempo se realizó la lectura de las muestras, donde cada tubo fue invertido cuidadosamente y con un solo movimiento a un ángulo de 180°.

Este procedimiento se repitió cuatro veces por cada lote evaluado de agua estéril para inyección.

2.1.6 Prueba de factores de interferencia

Finalmente, se realizó la prueba de factores de interferencia para determinar la capacidad del agua estéril para inyección de inhibir o potenciar la detección de endotoxinas. El procedimiento fue similar al de la confirmación de sensibilidad, pero en este caso se mezcló agua estéril para inyección con diluciones conocidas de endotoxinas. Cada condición se probó por cuadruplicado. Los resultados fueron evaluados mediante el cálculo de la media geométrica y aplicando los criterios de aceptación del capítulo <85> prueba de endotoxinas bacterianas de la (USP vigente) Farmacopea de los Estados Unidos [1].

2.1.7 Análisis de datos

Los resultados obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva, calculando media, mediana, moda, rango, desviación estándar, varianza, distribuciones de frecuencia y representación gráfica. Para este propósito se utilizó el software estadístico MINITAB®.

3. RESULTADOS

Se evaluaron tres lotes de agua estéril para inyección (Lotes A, B y C) mediante la prueba de interferencias utilizando la técnica *Gel-Clot*. Los resultados se presentan expresados como la media geométrica, la cual corresponde al valor estadístico obtenido a partir de los diferentes puntos finales positivos observados en una serie de diluciones de endotoxina realizadas.

Control de sensibilidad declarada del lisado

Los resultados del control de sensibilidad para todos los lotes (A, B y C) mostraron un patrón consistente (Tabla 1). Se obtuvieron resultados positivos para las concentraciones de 0.5 UE/mL y 0.25 UE/mL, mientras que las concentraciones de 0.125 UE/mL y 0.0625 UE/mL presentaron resultados negativos. El punto final se estableció en 0.25 λ para los tres lotes.

Tabla 1. Resultado Control para sensibilidad declarada del lisado

Control para sensibilidad declarada del lisado						
Lote PT #	Repetición	2λ (0.50 UE/mL)	λ (0.25 UE/mL)	λ ½ (0.125 UE/mL)	λ ¼ (0.0625 UE/mL)	Punto final
A	1	+	+	-	-	0.25
	2	+	+	-	-	0.25
B	1	+	+	-	-	0.25
	2	+	+	-	-	0.25
C	1	+	+	-	-	0.25
	2	+	+	-	-	0.25

Evaluación con productos sin endotoxinas y reactivo de LAL

Prueba con producto exento de endotoxinas

Los tres lotes evaluados (A, B y C) mostraron resultados negativos en las cuatro repeticiones realizadas para cada lote (Tabla 2). No se observó gelificación en ninguna de las determinaciones

Tabla 2. Prueba con producto sin endotoxinas y reactivo de LAL

Prueba con producto exento de endotoxinas				
Lote PT	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Repetición 4
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	-	-	-	-

Prueba de interferencias con solución stock de endotoxinas

Se evaluó la interferencia utilizando diferentes concentraciones de endotoxinas: 0.5 UE/mL, 0.25 UE/mL, 0.125 UE/mL y 0.0625 UE/mL (Tabla 3). Los tres lotes presentaron resultados positivos (+) para las concentraciones de 0.5 λ y 0.25 λ en todas las repeticiones. Para las concentraciones menores (0.125 UE/mL y 0.0625 UE/mL), los resultados fueron negativos (-) en todos los casos. El punto final se determinó en 0.25 UE/mL para todos los lotes evaluados.

Tabla 3. Resultados Prueba de interferentes con producto + solución stock de endotoxinas y reactivo de LAL

Lote PT	Repetición	Resultados prueba de interferentes				Punto final
		2λ (0.50 UE/mL)	λ (0.25 UE/mL)	$\lambda^{1/2}$ (0.125 UE/mL)	$\lambda^{1/4}$ (0.0625 UE/mL)	
A	1	+	+	-	-	0.25
	2	+	+	-	-	0.25
	3	+	+	-	-	0.25
	4	+	+	-	-	0.25
B	1	+	+	-	-	0.25
	2	+	+	-	-	0.25
	3	+	+	-	-	0.25
	4	+	+	-	-	0.25
C	1	+	+	-	-	0.25
	2	+	+	-	-	0.25
	3	+	+	-	-	0.25
	4	+	+	-	-	0.25



Fig. 1 Resultado de la prueba de interferencias del método Gel-Clot. A la izquierda: gelificación firme correspondiente al control positivo (0.50–0.25 UE/mL). Al centro y derecha: tubos correspondientes a concentraciones inferiores (0.125 y 0.0625 UE/mL) y al control negativo, donde no se observa formación de gel, indicando que el producto no interfiere con la reacción del lisado LAL.

Control negativo

El control negativo mostró resultados negativos para los tres lotes evaluados (Tabla 4), confirmando la ausencia de contaminación cruzada durante el desarrollo de las pruebas.

Tabla 4. Resultado prueba control negativo

Prueba control negativo			
Lote PT	Control	Repetición 1	Repetición 2
A	Negativo	-	-
B	Negativo	-	-
C	Negativo	-	-

La media geométrica de la prueba de interferencias es la sensibilidad medida del lisado en UE/mL y para el lote A fue de 0,25 UE/mL (Tablas 5, 7 y 9). Se realizaron cuatro determinaciones (series 1–4), todas con punto final de 0,25 UE/mL y logaritmo de $-0,602$ (Tabla 6, 8 y 10). El antilogaritmo calculado correspondió igualmente a 0,25 UE/mL. Según el capítulo <85> de la USP, el criterio de aceptación establece que la media geométrica debe encontrarse en el rango de $0,5\lambda$ a 2λ , donde λ representa la sensibilidad declarada del lisado (0,25 UE/mL). Por tanto, para este estudio el intervalo válido fue de 0,125 UE/mL a 0,5 UE/mL, dentro del cual se ubicó el resultado obtenido[1].

La media geométrica del control para sensibilidad declarada del lisado en el mismo lote fue de 0.25 UE/mL (Tabla 6,8 y 10). Se realizaron dos determinaciones con resultados consistentes, presentando el mismo punto final y logaritmo del punto final que la prueba de interferencias.

Los lotes B y C mostraron resultados idénticos a los obtenidos para el lote A, con medias geométricas de 0.25 UE/mL tanto para la prueba de interferencias como para el control de sensibilidad declarada del lisado, cumpliendo igualmente con el criterio establecido.

Tabla 5. Media geométrica de la prueba de interferencias en el producto agua estéril para inyección lote

A			
Media geométrica prueba de interferencias			
Lote PT	Serie	Punto final	Log punto final
A	1	0.25	-0.602
	2	0.25	-0.602
	3	0.25	-0.602
	4	0.25	-0.602
Media geométrica			0.25
Concepto			Cumple

$$\text{Antilogaritmo} \left(\frac{\sum e}{f} \right) = \frac{(-0.062) + (-0.062) + (-0.062) + (-0.062)}{4} = -0.602$$

$$\text{Antilogaritmo}(-0.602) = 0.25$$

Tabla 6. Media geométrica del control para sensibilidad declarada del lisado en el producto agua estéril para inyección lote A

Media geométrica del control para sensibilidad declarada del lisado			
Lote PT	Serie	Punto final	Log punto final
A	1	0.25	-0.602
	2	0.25	-0.602
Media geométrica			0.25
Concepto			Cumple

$$\text{Antilogaritmo} \left(\frac{\sum e}{f} \right) = \frac{(-0.062) + (-0.062)}{2} = -0.602$$

$$\text{Antilogaritmo}(-0.602) = 0.25$$

Tabla 7. Media geométrica de la prueba de interferencias en el producto agua estéril para inyección lote

B			
Media geométrica prueba de interferencias			
Lote PT	Serie	Punto final	Log punto final
B	1	0.25	-0.602
	2	0.25	-0.602
	3	0.25	-0.602
	4	0.25	-0.602
Media geométrica			0.25
Concepto			Cumple

$$\text{Antilogaritmo} \left(\frac{\sum e}{f} \right) = \frac{(-0.062) + (-0.062) + (-0.062) + (-0.062)}{4} = -0.602$$

$$\text{Antilogaritmo}(-0.602) = 0.25$$

Tabla 8. Media geométrica del control para sensibilidad declarada del lisado en el producto agua estéril para inyección lote B

Media geométrica del control para sensibilidad declarada del lisado			
Lote PT	Serie	Punto final	Log punto final
B	1	0.25	-0.602
	2	0.25	-0.602
Media geométrica			0.25
Concepto			Cumple

$$\text{Antilogaritmo} \left(\frac{\sum e}{f} \right) = \frac{(-0.062) + (-0.062)}{2} = -0.602$$

$$\text{Antilogaritmo}(-0.602) = 0.25$$

Tabla 9. Media geométrica de la prueba de interferencias en el producto agua estéril para inyección lote C

Media geométrica prueba de interferencias			
Lote PT	Serie	Punto final	Log punto final
C	1	0.25	-0.602
	2	0.25	-0.602
	3	0.25	-0.602
	4	0.25	-0.602
Media geométrica			0.25
Concepto			Cumple

$$\text{Antilogaritmo} \left(\frac{\sum e}{f} \right) = \frac{(-0.062) + (-0.062) + (-0.062) + (-0.062)}{4} = -0.602$$

$$\text{Antilogaritmo}(-0.602) = 0.25$$

Tabla 10. Media geométrica del control para sensibilidad declarada del lisado en el producto agua estéril para inyección lote C

Media geométrica del control para sensibilidad declarada del lisado			
Lote PT	Serie	Punto final	Log punto final
C	1	0.25	-0.602
	2	0.25	-0.602
Media geométrica			0.25
Concepto			Cumple

$$\text{Antilogaritmo} \left(\frac{\sum e}{f} \right) = \frac{(-0.062) + (-0.062)}{2} = -0.602$$

$$\text{Antilogaritmo}(-0.602) = 0.25$$

Todos los lotes de agua estéril para inyección evaluados (A, B y C) cumplieron con los criterios establecidos para la prueba de interferencias mediante la técnica *Gel-Clot*. La media geométrica obtenida fue consistente en 0.25 UE/mL para todos los lotes, tanto en la prueba de interferencias como en el control de sensibilidad declarada del

lisado. Los controles negativos confirmaron la ausencia de interferencias metodológicas durante la ejecución de las pruebas.

4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la prueba de endotoxinas bacterianas aplicada al agua estéril para inyección fueron satisfactorios y se mantuvieron dentro de los límites establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP <85>) La prueba se considera válida cuando se cumplen las tres condiciones siguientes: (1) las réplicas de la solución de control negativo sean negativas; (2) las réplicas de la solución evaluada junto con la presencia de endotoxinas son positivas; y (3) La concentración final de la media geométrica de la solución está en el rango de 2λ a $\lambda/2$ [1], lo cual confirma la hipótesis inicial de que este insumo cumple con las exigencias de calidad para su uso en productos parenterales. La técnica de *Gel-Clot* permitió verificar la ausencia de endotoxinas en las muestras analizadas y su validez fue confirmada mediante controles positivos y negativos, así como con la verificación de sensibilidad del lisado.

Durante la lectura de las muestras correspondientes a la prueba de factores de interferencia, se observó la formación de gel firme en los tubos que contenían las concentraciones de 2λ y λ , mientras que en las concentraciones de $\lambda/2$ y $\lambda/4$ no se evidenció gelificación. Este comportamiento fue semejante al obtenido en la prueba de sensibilidad del lisado, lo que indica que la respuesta del reactivo LAL frente a las diferentes concentraciones de endotoxina fue consistente en ambas evaluaciones. Este patrón nos confirma dos aspectos fundamentales: Primero, que no existe inhibición, porque si el producto inhibiera la reacción del LAL, no se formaría gel ni siquiera en las concentraciones altas. Y segundo, que tampoco existe potenciación, porque de ser así, veríamos gelificación incluso en diluciones inferiores a la sensibilidad declarada del lisado. En conjunto, estos resultados demuestran que el agua evaluada no altera la reacción enzimática del LAL y que la detección de endotoxinas es completamente fiable en esta matriz. Asimismo, los controles negativos realizados con agua libre de endotoxinas no mostraron formación de gel, lo cual demuestra que el producto no contiene factores que puedan potenciar o enmascarar la interacción entre el reactivo LAL y la endotoxina.

En relación con la sensibilidad declarada del lisado según lo establecido en el capítulo <85> de la USP[1], la técnica de *Gel-Clot* demostró ser una estrategia confiable para la detección de endotoxinas. Los resultados de los tres lotes analizados mostraron una media geométrica de los puntos finales consistente de 0.25 UE/mL, cumpliendo satisfactoriamente con el criterio de aceptación de la USP <85>[1]. Este criterio requiere que la sensibilidad del lisado se confirme dentro del rango de 0.5λ a 2λ . Estos hallazgos respaldan tanto la reproducibilidad del procedimiento como la calidad del agua empleada en la industria farmacéutica.

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con la evidencia científica disponible. Investigaciones en matrices complejas, como la de Zhao (2025)[11], demuestran que los solventes y excipientes insolubles pueden generar interferencias que deben ser rigurosamente controladas mediante pruebas específicas. Sin embargo, cuando estas interferencias son mitigadas, el método *Gel-Clot* ofrece resultados fiables y reproducibles. En el caso del agua estéril para inyección evaluada en Laboratorios EDO S.A.S., la matriz es químicamente simple y libre de componentes que afecten la cascada enzimática del LAL, por lo que los resultados observados en las pruebas de ausencia de inhibición o potenciación, punto final constante y sensibilidad verificada, son plenamente consistentes con lo descrito en la literatura científica. Asimismo, la evidencia clínica de casos fatales asociados al uso de agua contaminada refuerza la importancia de asegurar la ausencia de endotoxinas mediante metodologías validadas como la empleada en este estudio. En conjunto, estos elementos demuestran que los procedimientos aplicados permiten detectar de manera confiable la presencia o ausencia de interferencias, alineándose con las mejores prácticas científicas más allá de lo estrictamente normativo.

No obstante, se identificaron posibles limitaciones en el desarrollo del ensayo. Una de ellas fue la dependencia del reactivo de lisado de amebocitos, la técnica de *Gel-Clot* no permite una cuantificación precisa de las endotoxinas, sino únicamente su detección por encima o por debajo del límite establecido, lo que podría representar una restricción frente a otros métodos turbidimétricos o cromogénicos.

A pesar de estas limitaciones, los hallazgos obtenidos demuestran que el agua estéril para inyección evaluada cumplió con las especificaciones reglamentarias, aportando evidencia de su idoneidad en la fabricación de

medicamentos estériles. Estos resultados son consistentes con lo esperado y contribuyen a garantizar la seguridad del paciente al minimizar el riesgo de reacciones pirogénicas asociadas con endotoxinas bacterianas.

Los resultados son consistentes con estudios previos que han demostrado la confiabilidad de la técnica *Gel-Clot* para la detección de endotoxinas y la importancia de validar la ausencia de interferencias en matrices acuosas. La metodología empleada se alinea con las mejores prácticas internacionales para el control microbiológico de productos farmacéuticos, particularmente en lo relacionado con la validación de métodos analíticos según criterios.

5. CONCLUSIONES

- La prueba de interferencia evidenció que los lotes (A, B y C) del agua estéril para inyección evaluada no presentaron efectos inhibitorios ni potenciadores en la detección de endotoxinas, lo que refuerza la aplicabilidad del ensayo en el control de calidad rutinario.
- Los lotes (A, B y C) del agua estéril para inyección producidos por Laboratorios EDO S.A.S. cumplieron con los criterios de aceptación establecidos en la USP <85>[1] para la prueba de endotoxinas bacterianas mediante la técnica de *Gel-Clot*, lo que demuestra su idoneidad y calidad para su uso en la fabricación de medicamentos estériles.
- La ausencia de gelificación en los controles negativos y la respuesta positiva en los controles positivos confirmaron la validez del método y la sensibilidad del lisado utilizado, asegurando la confiabilidad de los resultados obtenidos.
- Una limitación del estudio fue que la técnica de *Gel-Clot* únicamente permite la detección cualitativa de endotoxinas, sin cuantificar niveles exactos, lo cual podría abordarse en futuros estudios mediante el uso de métodos cromogénicos o turbidimétricos que permitan una mayor sensibilidad y exactitud.
- Este trabajo contribuye a fortalecer las prácticas de aseguramiento de la calidad en la industria farmacéutica veterinaria y resalta la importancia de aplicar metodologías validadas que garanticen la seguridad de los pacientes frente a reacciones pirogénicas.
- Se evidenció que el ensayo *Gel-Clot* es una herramienta robusta para el control de calidad, aunque su limitación principal es su carácter cualitativo; por ello, se sugiere en futuras investigaciones complementar con técnicas cromogénicas o turbidimétricas.
- Realizar la verificación de pH antes de iniciar el montaje de las pruebas ya que este afecta la prueba de *Gel-Clot* principalmente al influir en la actividad de las enzimas (como la del lisado de amebocitos) y en la coagulación de las proteínas.
- Realizar la verificación de conductividad antes de iniciar la prueba teniendo en cuenta que una concentración de iones inusualmente alta en la muestra puede actuar como una interferencia química en la prueba, afectando la cascada de reacciones enzimáticas.

6. AGRADECIMIENTOS

Las autoras expresan su sincero reconocimiento al Profesor Carlos A. Martínez, Director del trabajo de grado, por su orientación académica, supervisión metodológica y apoyo constante durante el desarrollo de esta investigación. Su experiencia y dedicación fueron fundamentales para el logro de los objetivos propuestos.

Extendemos nuestro agradecimiento al Profesor Yimy W. Cruz, Codirector del trabajo de grado, por su valiosa asesoría técnica y científica a lo largo del proceso investigativo. Reconocemos especialmente su contribución profesional, conocimiento y trayectoria en microbiología farmacéutica, aun cuando ya no se encuentre vinculado a la universidad.

De igual manera, se agradece a la **Universidad Santiago de Cali** por el apoyo institucional brindado durante la formación académica.

Expresamos nuestra gratitud a **Laboratorios EDO S.A.S.** por facilitar el acceso a sus instalaciones, equipos especializados e insumos técnicos indispensables para la ejecución experimental de este trabajo. Su colaboración fue esencial para la validación práctica de los métodos evaluados en condiciones industriales reales.

Finalmente, agradecemos a todo el personal técnico y profesional que, de manera directa o indirecta, contribuyó al desarrollo exitoso de esta investigación.

Declaración de conflicto de intereses: Las autoras declaran que no existe conflicto de intereses en la realización de este trabajo de investigación.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] “Farmacopea de los Estados Unidos (). Capítulo General, <85> Prueba de Endotoxinas Bacterianas . USP-NF. Rockville, MD: Farmacopea de los Estados Unidos.” Accessed: Apr. 27, 2025. [Online]. Available: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M98830_02_01.html
- [2] J. Mauricio and M. Gonzalez, “Generalidades del liposacárido,” 2018, *Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, 2018*. Accessed: Apr. 28, 2025. [Online]. Available: <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/1343>
- [3] E. De Bioquímica and Y. Farmacia, “Validación de la determinación de endotoxinas bacterianas por el método LAL en la solución estéril dextrosa al 5% en solución salina al 0.9% de la empresa Ginsberg Ecuador S.A.,” 2015, Accessed: Apr. 28, 2025. [Online]. Available: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4630>
- [4] N. Burguet and L. C. Brito, “Validación del método LAL para determinar endotoxinas bacterianas en el inyectable heparina sódica,” *Vaccinmonitor*, vol. 21, no. 3, pp. 32–36, 2012, Accessed: Apr. 27, 2025. [Online]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2012000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [5] W. B. Anderson, P. M. Huck, D. G. Dixon, and C. I. Mayfield, “Endotoxin inactivation in water by using medium-pressure UV lamps,” *Appl Environ Microbiol*, vol. 69, no. 5, pp. 3002–3004, May 2003, doi: 10.1128/AEM.69.5.3002-3004.2003;JOURNAL:JOURNAL:AM;ISSUE:ISSUE:DOI.
- [6] C. Carrillo, J. Ospina, D. Aldana, J. del C. Arias, and C. Echeverri, “VALORACIÓN DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS EN RANITIDINA Y PENICILINA G SÓDICA INYECTABLE MEDIANTE LA PRUEBA DE LISADO DEL AMEBOCITO DE *Limulus*,” *Univ Sci (Bogota)*, vol. 11, no. 1, pp. 15–28, Jan. 2006, Accessed: May 07, 2025. [Online]. Available: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4943>
- [7] La comisión de la comunidad Andina, “Registro de Medicamentos de uso Veterinario. Resolución 62542 de 2020,” *Academy of Management Journal*, vol. 5, no. 3, pp. 1–20, 2002.
- [8] “Pruebas in vitro (Limulus Amebocyt Lysate test (LAL) y Prueba de Activación de Monocitos (MAT)) como sustitutos de la prueba de pirógenos en conejos, para sueros antiofidicos: Revisión de alcance.” Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/84186>
- [9] “(161) Dispositivos Médicos—Pruebas de Endotoxinas Bacterianas y Pirógenos.” Accessed: Apr. 29, 2025. [Online]. Available: https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M98910_01_02.html
- [10] R. Perdomo Morales, “Ensayo del lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL),” *Revista Cubana de Farmacia*, vol. 38, no. 1, pp. 1–1, 2004, Accessed: Apr. 27, 2025. [Online]. Available: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152004000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- [11] Y. Zhao, T. Cai, H. Sun, T. Liu, Y. Pei, and H. Xu, “Testing Methods for Bacterial Endotoxin in a Pharmaceutical Excipient of Trimethyl-Phloroglucinol [药用辅料三甲基间苯三酚的细菌内毒素检查方法研究],” *Chinese Journal of Pharmacovigilance*, vol. 22, no. 4, pp. 368–371, Apr. 2025, doi: 10.19803/j.1672-8629.20240820.

ANEXO:

Endotoxinas: Lipopolisacáridos (LPS) que forman parte integral de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Estas moléculas son liberadas durante la lisis celular y mantienen su actividad pirogénica incluso después de la muerte bacteriana [1][2].

LAL (Lisado de Amebocito de *Limulus*): El LAL es un reactivo biológico obtenido de los amebocitos del cangrejo herradura (*Limulus polyphemus* o *Tachypleus tridentatus*). Estos amebocitos contienen una cascada enzimática

altamente sensible que se activa en presencia de endotoxinas bacterianas, produciendo la formación de un coágulo visible (Gel-Clot) o una reacción medible por métodos turbidimétricos o cromogénicos [1].

Agua libre de pirógenos: Es el agua de alta pureza, generalmente obtenida como agua para inyección (WFI, *Water for Injection*), que cumple con la condición de estar libre de endotoxinas y otros pirógenos detectables. Se utiliza para preparar diluciones de endotoxina estándar, reconstituir reactivos y realizar controles en las pruebas de endotoxinas [1].

Lambda (λ): El símbolo λ representa la sensibilidad marcada del reactivo LAL expresada en unidades de endotoxina por mililitro (UE/mL). Corresponde a la menor concentración de endotoxina capaz de producir una reacción positiva (formación de gel) en la técnica Gel-Clot, bajo condiciones estándar [1].

Sensibilidad del lisado: En el contexto de la prueba Gel-Clot, la sensibilidad es la capacidad del reactivo LAL para detectar la concentración más baja de endotoxina que produce un coágulo firme y estable. Se confirma experimentalmente mediante la media geométrica de los puntos finales, la cual debe encontrarse dentro del rango de $0,5\lambda$ a 2λ para validar el lote de reactivo y la prueba [1].

Media geométrica: La media geométrica es una medida estadística de tendencia central que se obtiene calculando el antilogaritmo del promedio de los logaritmos de un conjunto de valores. En el ensayo Gel-Clot, se utiliza para determinar la sensibilidad medida del lisado LAL a partir de los puntos finales observados en las series de diluciones de endotoxina. Su resultado expresa la concentración media geométrica del punto final y debe ubicarse entre $0,5\lambda$ y 2λ para validar la sensibilidad del reactivo [1].

UE (Unidades de Endotoxina): Las Unidades de Endotoxina (UE) son la unidad de medida internacionalmente reconocida para expresar la actividad biológica de las endotoxinas bacterianas. Una UE corresponde a la potencia pirogénica de una cantidad estandarizada de lipopolisacárido bacteriano, calibrada frente al estándar internacional de la OMS. En las pruebas de la USP <85>, las concentraciones de endotoxinas se reportan en UE/mL, UE/mg o UE/unidad biológica, según el tipo de producto en evaluación [1].

Punto final: En la técnica Gel-Clot, corresponde a la concentración más baja de endotoxina en una serie de diluciones decrecientes que es capaz de provocar la formación de un gel firme que permanece intacto después de la inversión del tubo a 180° . El punto final se determina visualmente y constituye la base para el cálculo de la media geométrica [1].

Preparación solución Stock 20 UE/mL

- a) **Preparación del tubo Solución Stock de endotoxinas (CSE):** Seleccionar un tubo apirógeno. Utilizando una micropipeta calibrada, transferir 30 microlitros (μL) del Control Estándar de Endotoxinas (CSE) con una concentración de 2000 UE/ml al tubo.
- b) **Adición de agua apirógena:** Empleando una micropipeta de mayor volumen, agregar cuidadosamente 2970 microlitros (μL) de agua apirógena certificada al mismo tubo que contiene el CSE.
- c) **Homogeneización de la mezcla:** Con la misma micropipeta usada para el agua apirógena, homogeneizar la mezcla aspirando y expulsando la solución al menos 10 veces. Mantener la punta sumergida y aspirar de diferentes puntos del tubo para asegurar una mezcla completa. Evitar la formación de burbujas o espuma.

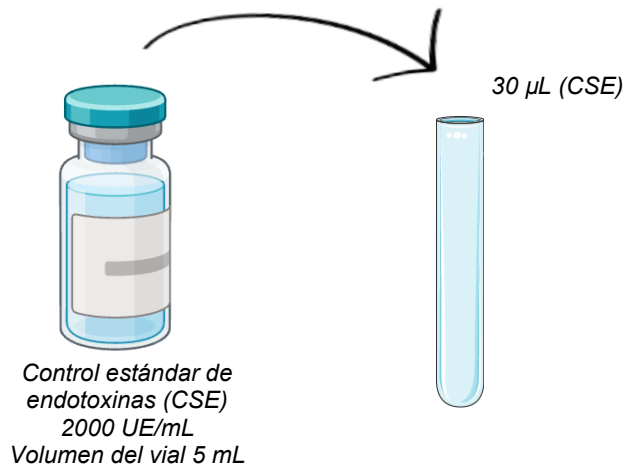


Diagrama 1. Preparación solución Stock 20 UE/mL a partir del control estándar de endotoxinas 2000 UE/mL

Determinación de volumen a tomar del control estándar de endotoxinas (CSE) a 2000 UE/mL para realizar solución Stock de endotoxinas a 20 UE/mL.

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$V1 (?) \times 2000 \frac{UE}{mL} = 3 mL \times 20 \frac{UE}{mL}$$

$$V1 = \frac{3 mL \times 20 \frac{UE}{mL}}{2000 \frac{UE}{mL}}$$

$$V1 = \frac{60 mL}{2000}$$

$$V1 = 0.03 mL \text{ Control estándar de endotoxinas (CSE)}$$

Conversión de unidades de μ L a mL para V1

$$0.03 mL (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 30 \mu L CSE$$

Determinación volumen a tomar del agua apirógena certificada para realizar solución Stock de endotoxinas a 20 UE/mL.

- *Volumen Final (V.F) = 3000 μ L o 3 mL*
- *Volumen Control estándar endotoxinas (V.CSE) = 30 μ L o 0.03 mL*
- *Volumen agua apirógena certificada (V.H₂O Apirógena) = ?*

$$V.H_2O \text{ Apirógena} = V.F - V.CSE$$

$$V.H_2O \text{ Apirógena} = 3000 \mu L - 30 \mu L$$

$$V.H_2O \text{ Apirógena} = 2970 \mu L$$

Preparación prueba sensibilidad del lisado

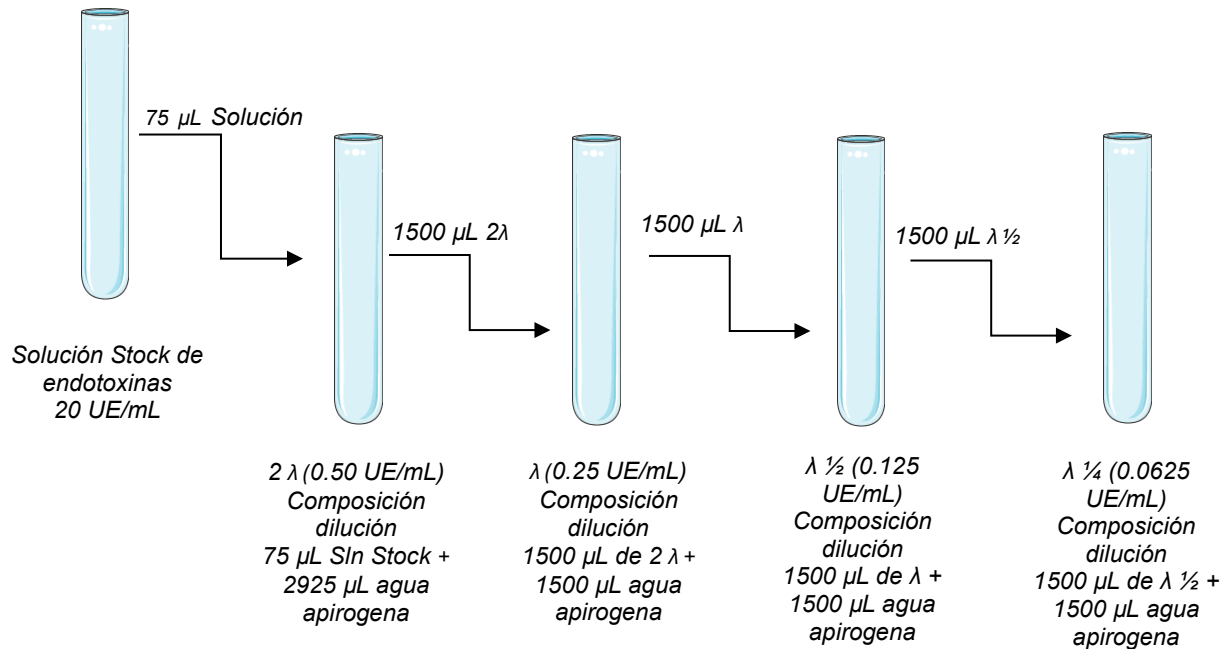


Diagrama 2: Preparación del control para sensibilidad declarada del lisado

Determinación de volumen a tomar de la solución stock de endotoxinas a 20 UE/mL para realizar 2 λ.

Fórmula a utilizar en los cálculos

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$V1 (?) \times 20 \frac{UE}{mL} = 3 mL \times 0.50 \frac{UE}{mL}$$

$$V1 = \frac{3 mL \times 0.50 \frac{UE}{mL}}{20 \frac{UE}{mL}}$$

$$V1 = \frac{1.5 mL}{20}$$

$$V1 = 0.075 mL \text{ Solución stock de endotoxinas}$$

Conversión de unidades de µL a mL para V1

$$0.075 mL (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 75 \mu L CSE$$

Determinación del volumen a tomar agua apirógena para realizar 2 λ

- Volumen Final (V.F) = 3000 µL o 3 mL
- Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E) = 75 µL o 0.075 mL
- Volumen solución muestra (V.SM) = ?

$$V.SM = V.F - V.S.S.E$$

$$V.SM = 3000 \mu L - 75 \mu L$$

$$V.SM = 2925 \mu L \text{ de agua apirógena}$$

Determinación de volumen a tomar de la solución 2 λ para realizar λ.

Fórmula a utilizar en los cálculos

$$V1.C1 = V2.C2$$

$$V1 (?) \times 0,5 \frac{UE}{mL} = 3 mL \times 0.25 \frac{UE}{mL}$$

$$V1 = \frac{3 mL \times 0.25 \frac{UE}{mL}}{0,5 \frac{UE}{mL}}$$

$$V1 = \frac{0.75 mL}{0,5}$$

$$V1 = 1,5 mL \text{ De la solución } 2 \lambda$$

Conversión de unidades de μL a mL para V1

$$1,5 mL (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 1500 \mu L \text{ De la solución } 2 \lambda$$

Determinación del volumen a tomar de agua apirógena para realizar λ

- *Volumen Final (V.F)* = 3000 μL o 3 mL
- *Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E)* = 150 μL o 0.15 mL
- *Volumen solución muestra (V.SM)* = ?

$$V.SM = V.F - V.S.S.E$$

$$V.SM = 3000 \mu L - 150 \mu L$$

$$V.SM = 2850 \mu L \text{ de agua apirógena}$$

Determinación de volumen a tomar de la solución λ para realizar ½ λ.

Fórmula a utilizar en los cálculos

$$V1.C1 = V2.C2$$

$$V1 (?) \times 0.25 \frac{UE}{mL} = 3 mL \times 0.125 \frac{UE}{mL}$$

$$V1 = \frac{3 mL \times 0.125 \frac{UE}{mL}}{0.25 \frac{UE}{mL}}$$

$$V1 = \frac{0.375 mL}{0.25}$$

$$V1 = 1,5 mL \text{ de la solución } \lambda$$

Conversión de unidades de μL a mL para V1

$$1,5 mL (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 1500 \mu L \text{ De la solución } \lambda$$

Determinación del volumen a tomar de agua apirógena para realizar $\frac{1}{2}$ λ

- *Volumen Final (V.F) = 3000 μ L o 3 mL*
- *Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E) = 1500 μ L o 1,5 mL*
- *Volumen solución muestra (V.SM) = ?*

$$\begin{aligned}V.SM &= V.F - V.S.S.E \\V.SM &= 3000 \mu L - 1500 \mu L \\V.SM &= 1500 \mu L \text{ de agua apirógena}\end{aligned}$$

Determinación de volumen a tomar de la solución $\frac{1}{2}$ λ para realizar $\frac{1}{4}$ λ .

Fórmula a utilizar en los cálculos

$$\begin{aligned}V1.C1 &= V2.C2 \\V1(?) \times 0.125 \frac{UE}{mL} &= 3 mL \times 0.065 \frac{UE}{mL} \\V1 &= \frac{3 mL \times 0.0625 \frac{UE}{mL}}{0.125 \frac{UE}{mL}} \\V1 &= \frac{0.1875 mL}{0.125} \\V1 &= 1,5 mL \text{ de la solución } \frac{1}{2} \lambda\end{aligned}$$

Conversión de unidades de μ L a mL para V1

$$1,50 \cancel{mL} (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 \cancel{mL}} = 1500 \mu L \text{ de la solución } \frac{1}{2} \lambda$$

Determinación del volumen a tomar de agua apirógena para realizar $\frac{1}{4}$ λ

- *Volumen Final (V.F) = 3000 μ L o 3 mL*
- *Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E) = 1500 μ L o 1,5 mL*
- *Volumen solución muestra (V.SM) = ?*

$$\begin{aligned}V.SM &= V.F - V.S.S.E \\V.SM &= 3000 \mu L - 1500 \mu L \\V.SM &= 1500 \mu L \text{ de agua apirógena}\end{aligned}$$

Preparación prueba de interferentes (Endotoxinas + producto)

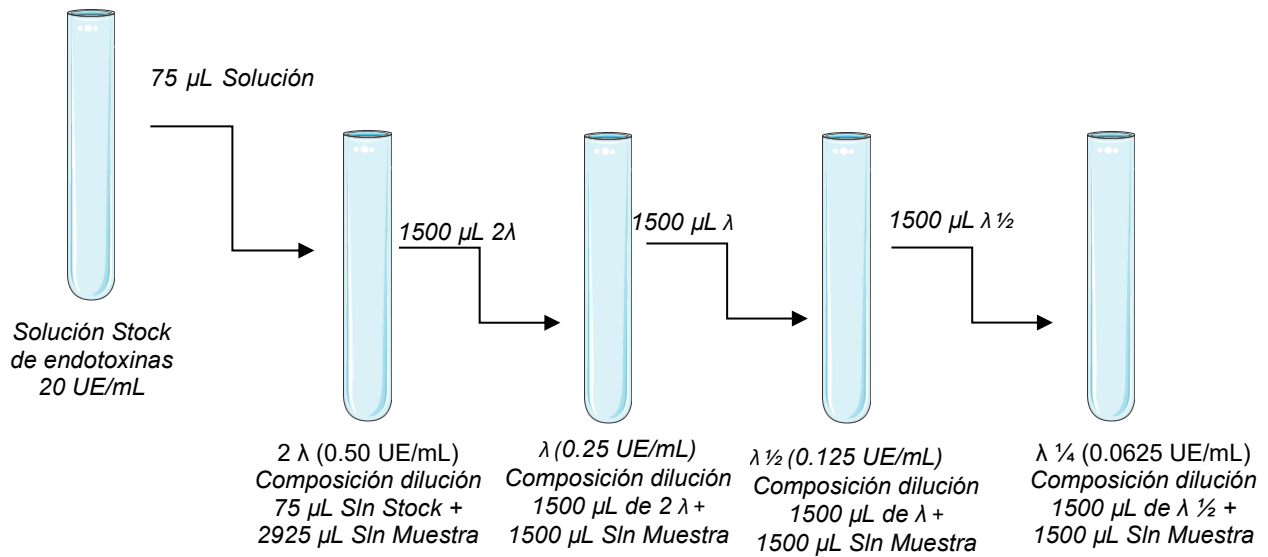


Diagrama 3: Preparación prueba de interferentes (Endotoxinas + producto (muestra))

Determinación de volumen a tomar de la solución stock de endotoxinas a 20 UE/mL para realizar 2 λ.

Fórmula a utilizar en los cálculos

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$$

$$V1(?) \times 20 \frac{UE}{mL} = 3 mL \times 0.50 \frac{UE}{mL}$$

$$V1 = \frac{3 mL \times 0.50 \frac{UE}{mL}}{20 \frac{UE}{mL}}$$

$$V1 = \frac{1.5 mL}{20}$$

$$V1 = 0.075 mL \text{ Solución stock de endotoxinas}$$

Conversión de unidades de µL a mL para V1

$$0.075 mL (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 75 \mu L CSE$$

Determinación del volumen a tomar del producto (Agua estéril para inyección) para realizar 2 λ

- Volumen Final (V.F) = 3000 µL o 3 mL
- Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E) = 75 µL o 0.075 mL
- Volumen solución muestra (V.SM) = ?

$$V.SM = V.F - V.S.S.E$$

$$V.SM = 3000 \mu L - 75 \mu L$$

$$V.SM = 2925 \mu L \text{ de solución muestra (Agua estéril para inyección)}$$

Determinación de volumen a tomar de la solución 2 λ para realizar λ.

Fórmula a utilizar en los cálculos

$$V1.C1 = V2.C2$$

$$V1(?) \times 0,5 \frac{UE}{mL} = 3 mL \times 0.25 \frac{UE}{mL}$$

$$V1 = \frac{3 mL \times 0.25 \frac{UE}{mL}}{0,5 \frac{UE}{mL}}$$

$$V1 = \frac{0.75 mL}{0,5}$$

$$V1 = 1,5 mL \text{ de la solución } 2\lambda$$

Conversión de unidades de μL a mL para V1

$$1,5 mL (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 1500 \mu L \text{ de la solución } 2\lambda$$

Determinación del volumen a tomar del producto (Agua estéril para inyección) para realizar λ

- *Volumen Final (V.F)* = 3000 μL o 3 mL
- *Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E)* = 150 μL o 0.15 mL
- *Volumen solución muestra (V.SM)* = ?

$$V.SM = V.F - V.S.S.E$$

$$V.SM = 3000 \mu L - 150 \mu L$$

$$V.SM = 2850 \mu L \text{ de solución muestra (Agua estéril para inyección)}$$

Determinación de volumen a tomar de la solución λ para realizar ½ λ.

Fórmula a utilizar en los cálculos

$$V1.C1 = V2.C2$$

$$V1(?) \times 0.25 \frac{UE}{mL} = 3 mL \times 0.125 \frac{UE}{mL}$$

$$V1 = \frac{3 mL \times 0.125 \frac{UE}{mL}}{0.25 \frac{UE}{mL}}$$

$$V1 = \frac{0.375 mL}{0.25}$$

$$V1 = 1,5 mL \text{ de la solución } \lambda$$

Conversión de unidades de μL a mL para V1

$$1,5 mL (CSE) \times \frac{1000 \mu L}{1 mL} = 1500 \mu L \text{ De la solución } \lambda$$

Determinación del volumen a tomar del producto (Agua estéril para inyección) para realizar $\frac{1}{2} \lambda$

- *Volumen Final (V.F)* = 3000 μL o 3 mL
- *Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E)* = 1500 μL o 1,5 mL
- *Volumen solución muestra (V.SM)* = ?

$$\begin{aligned}V.SM &= V.F - V.S.S.E \\V.SM &= 3000 \mu\text{L} - 1500 \mu\text{L} \\V.SM &= 1500 \mu\text{L de solución muestra (Agua estéril para inyección)}\end{aligned}$$

Determinación de volumen a tomar de la solución $\frac{1}{2} \lambda$ para realizar $\frac{1}{4} \lambda$.

Formula a utilizar en los cálculos

$$\begin{aligned}V1.C1 &= V2.C2 \\V1 (?) \times 0.125 \frac{\text{UE}}{\text{mL}} &= 3 \text{ mL} \times 0.065 \frac{\text{UE}}{\text{mL}} \\V1 &= \frac{3 \text{ mL} \times 0.0625 \frac{\text{UE}}{\text{mL}}}{0.125 \frac{\text{UE}}{\text{mL}}} \\V1 &= \frac{0.1875 \text{ mL}}{0.125} \\V1 &= 1,5 \text{ mL de la solución } \frac{1}{2} \lambda\end{aligned}$$

Conversión de unidades de μL a mL para **V1**

$$1,50 \text{ mL (CSE)} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = 1500 \mu\text{L de la solución } \frac{1}{2} \lambda$$

Determinación del volumen a tomar del producto (Agua estéril para inyección) para realizar $\frac{1}{4} \lambda$

- *Volumen Final (V.F)* = 3000 μL o 3 mL
- *Volumen Solución stock de endotoxinas (V.S.S.E)* = 1500 μL o 1,5 mL
- *Volumen solución muestra (V.SM)* = ?

$$\begin{aligned}V.SM &= V.F - V.S.S.E \\V.SM &= 3000 \mu\text{L} - 1500 \mu\text{L} \\V.SM &= 1500 \mu\text{L de solución muestra (Agua estéril para inyección)}\end{aligned}$$

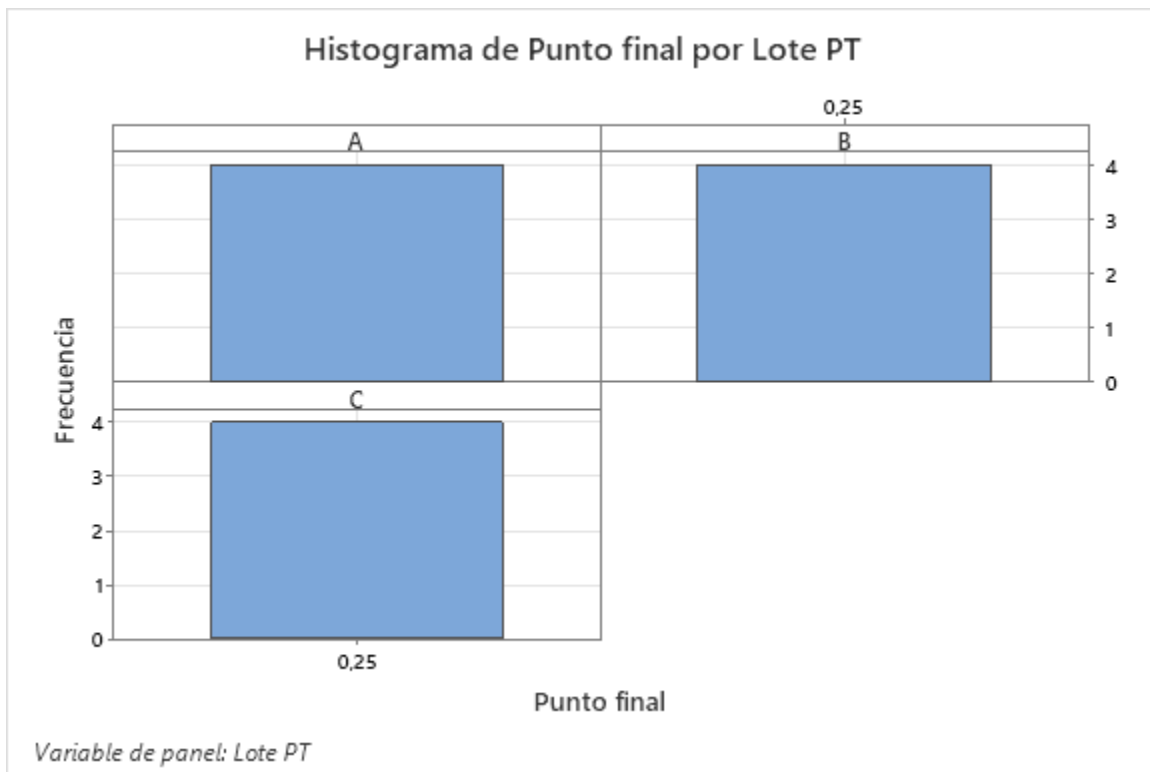
Resultados estadísticos obtenidos con Minitab® prueba factores de interferencia.

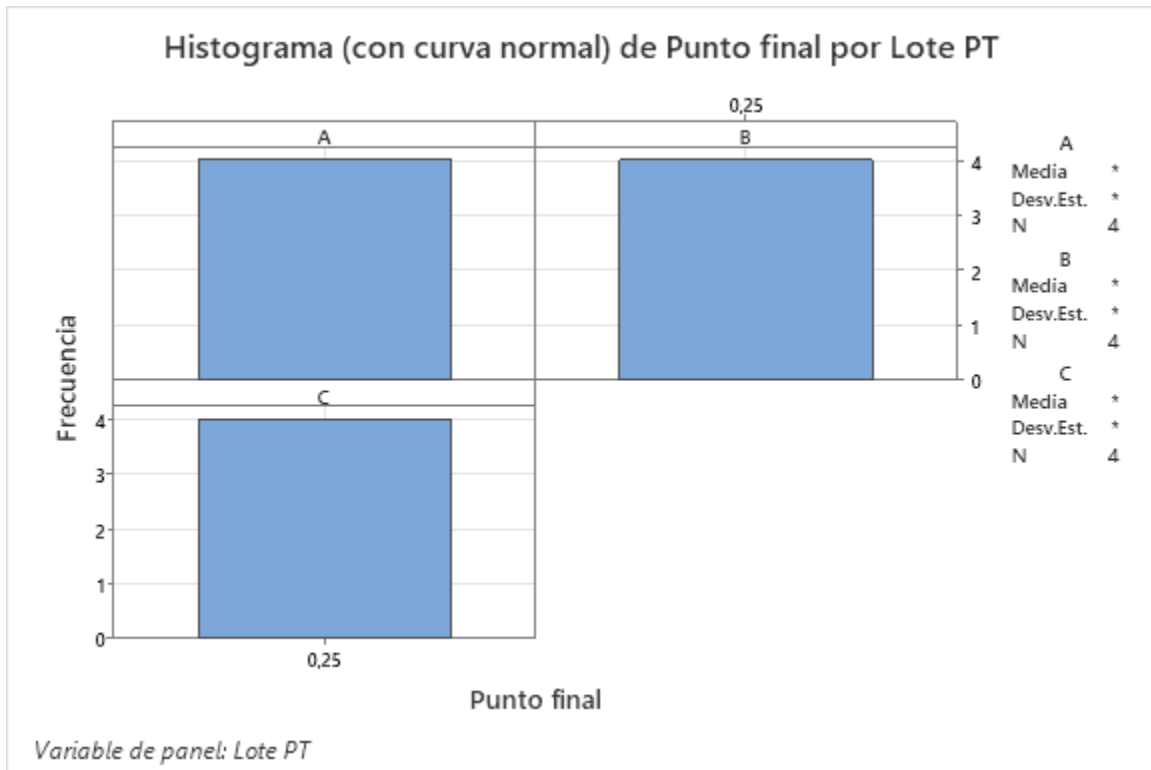
En este anexo se presentan los resultados de los análisis estadísticos realizados con el software Minitab® para el Lote A de agua estéril para inyección, incluyendo tablas descriptivas, cálculos de la media geométrica y representaciones gráficas.

Dado que los Lotes B y C mostraron resultados idénticos en las pruebas de interferencia y controles de sensibilidad (con medias geométricas de 0,25 UE/mL y cumplimiento de los criterios establecidos en USP <85> [1]), se decidió no duplicar la información en los anexos y mostrar únicamente la evidencia del Lote A como representativa del comportamiento de los tres lotes evaluados.

Estadísticas

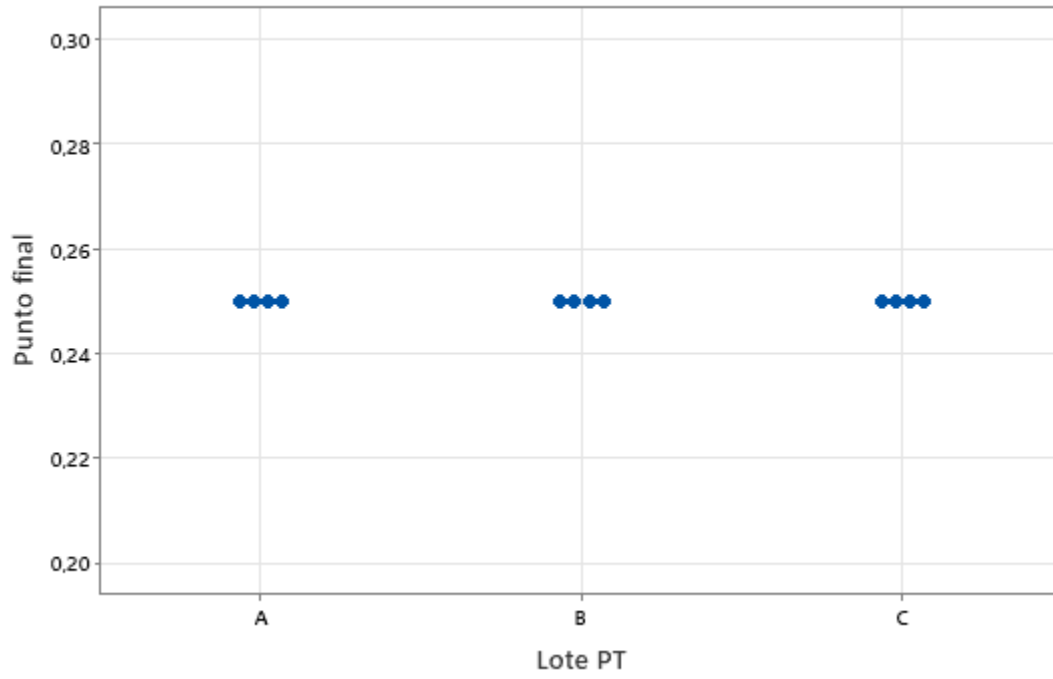
Variable	Lote PT	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar	Mínimo
Punto final	A	4	0	0,25000		0,000000	0,000000	0,00	0,25000
	B	4	0	0,25000		0,000000	0,000000	0,00	0,25000
	C	4	0	0,25000		0,000000	0,000000	0,00	0,25000
Variable	Lote PT	Q1	Mediana	Q3	Máximo				
Punto final	A	0,25000	0,25000	0,25000	0,25000				
	B	0,25000	0,25000	0,25000	0,25000				
	C	0,25000	0,25000	0,25000	0,25000				



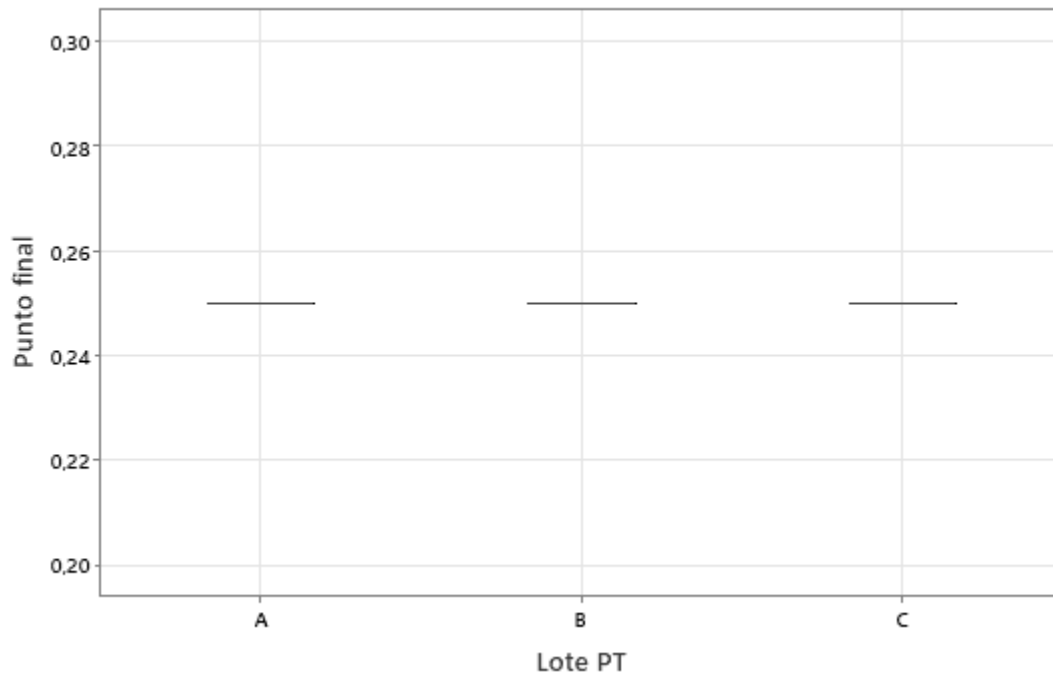


*** NOTA *** La distribución no se pudo ajustar. El número de filas de datos distintas en Punto final (de Lote PT = A, B y C) debe ser mayor que o igual al número de parámetros de distribución estimados.

Gráfica de valores individuales de Punto final vs. Lote PT



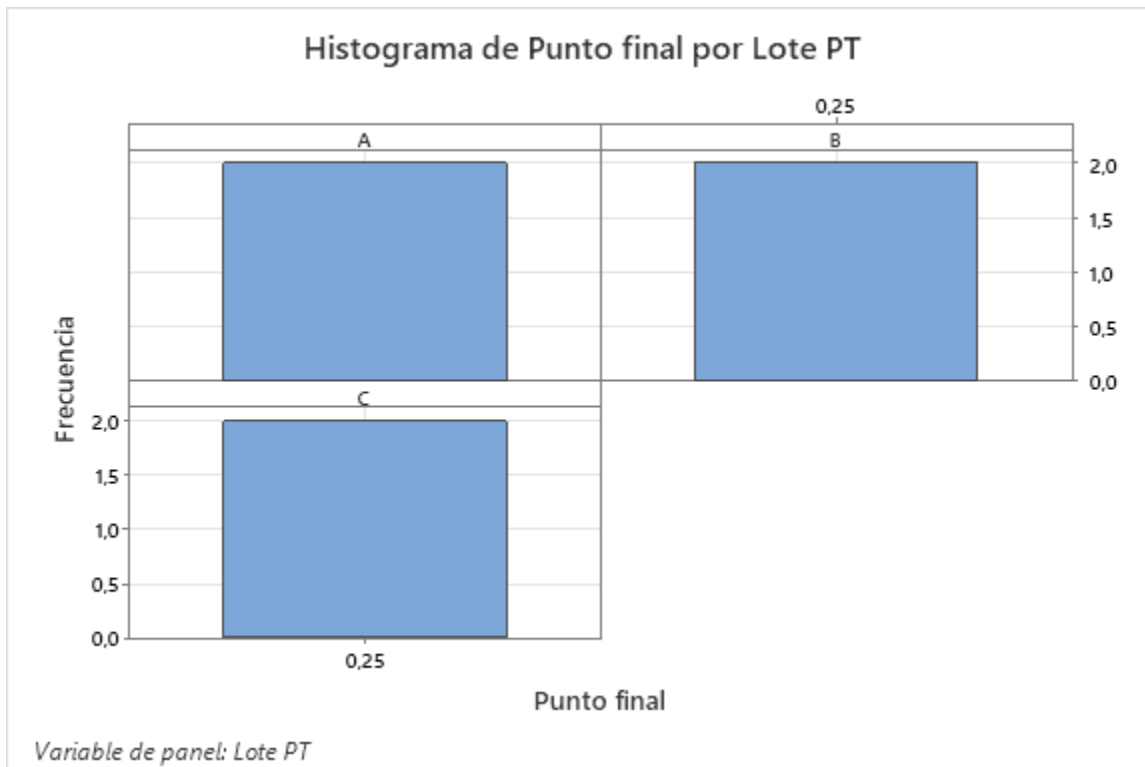
Gráfica de caja de Punto final

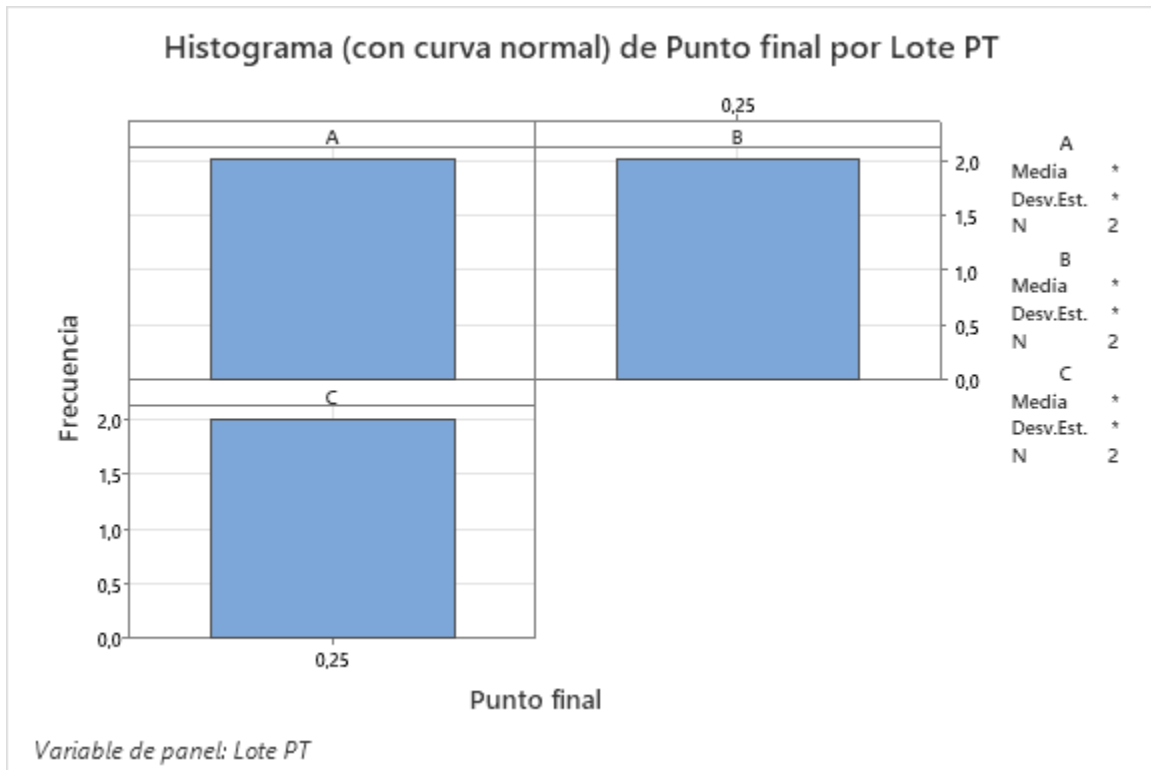


Estadística de los resultados de la curva para la verificación del lisado

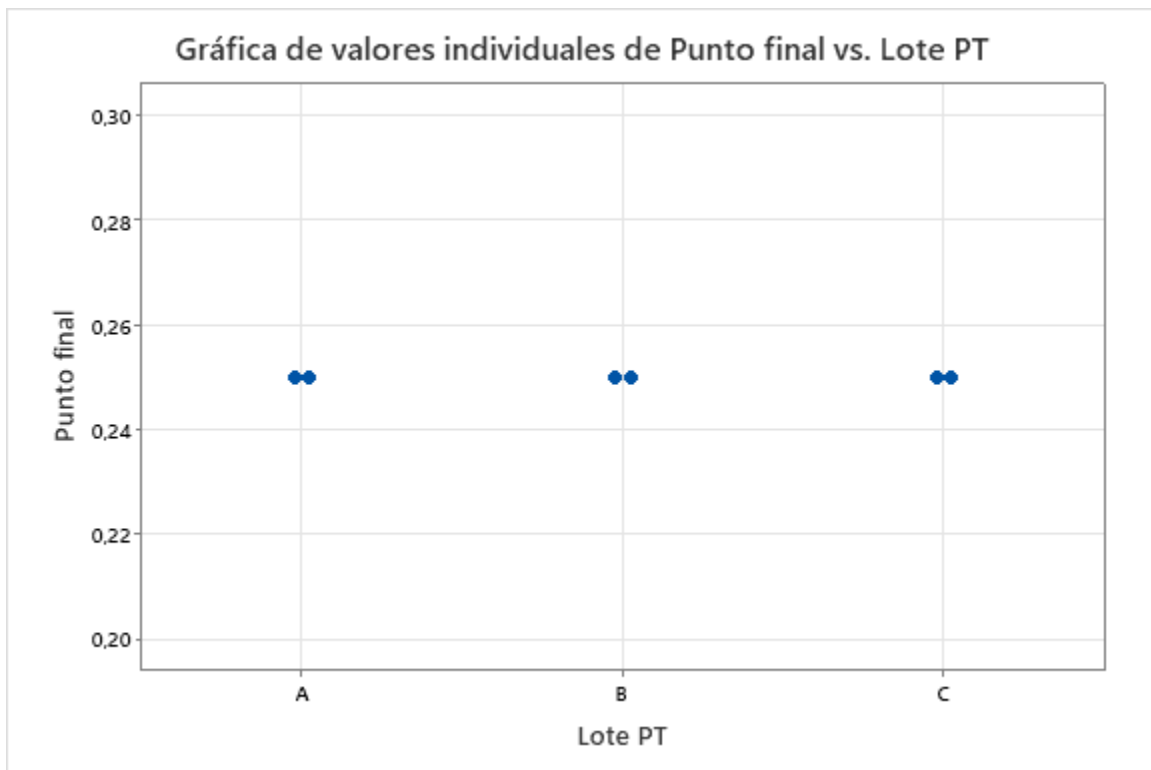
Estadísticas

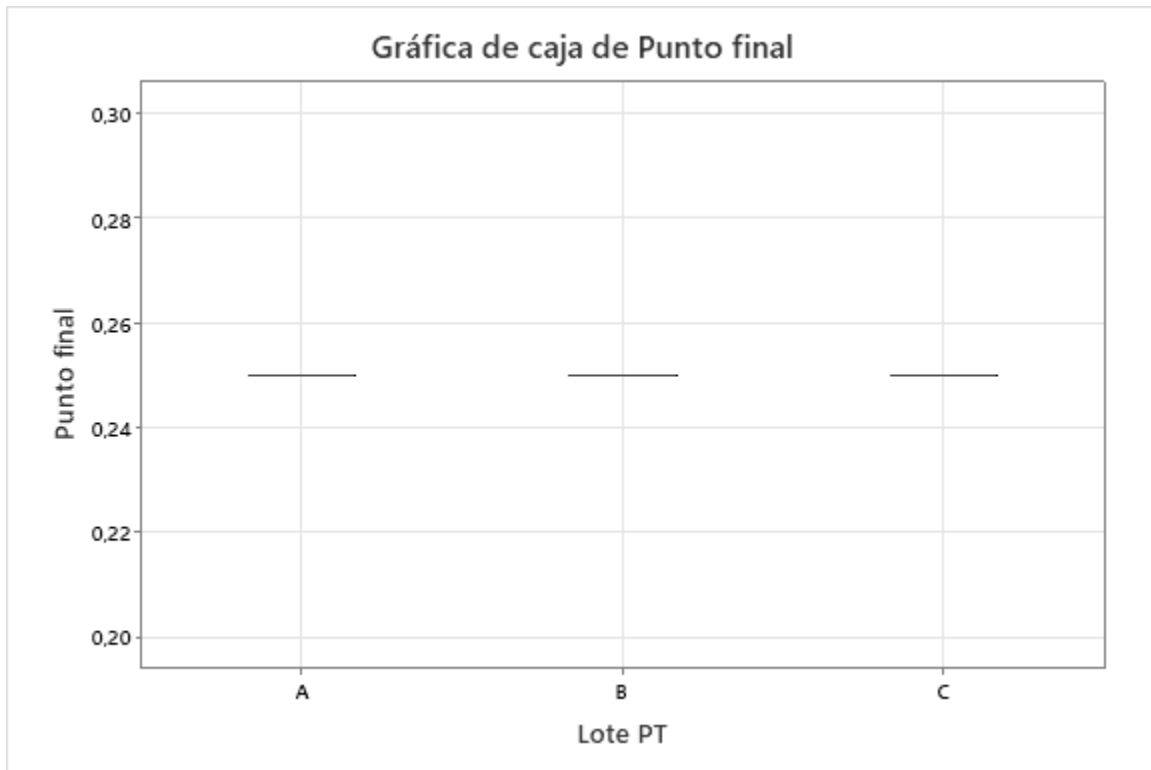
Variable	Lote PT	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar	Mínimo	Q1
Punto final	A	2	0	0,25000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	0,25000	*
	B	2	0	0,25000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	0,25000	*
	C	2	0	0,25000	0,000000	0,000000	0,000000	0,00	0,25000	*
Variable	Lote PT	Mediana	Q3	Máximo						
Punto final	A	0,25000	*	0,25000						
	B	0,25000	*	0,25000						
	C	0,25000	*	0,25000						





*** NOTA *** La distribución no se pudo ajustar. El número de filas de datos distintas en Punto final (de Lote PT = A, B y C) debe ser mayor que o igual al número de parámetros de distribución estimados.



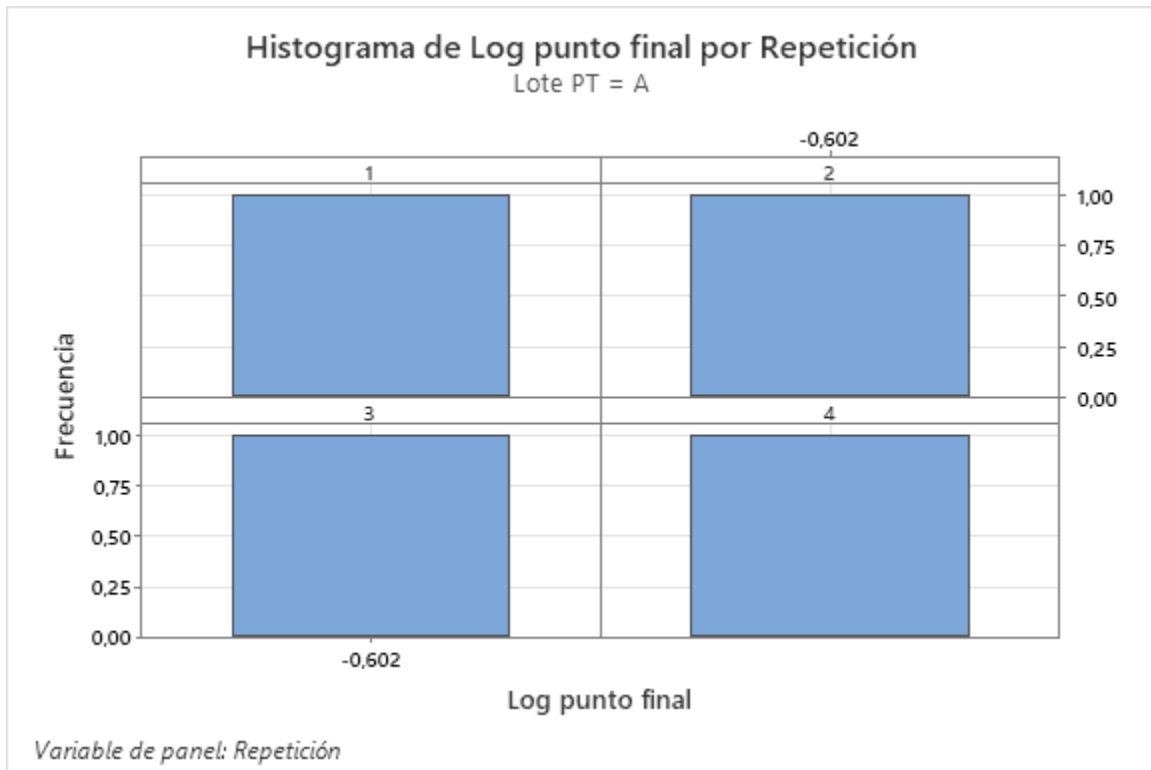


Estadística por lote de los resultados de la media geométrica

Resultados de Lote PT = A

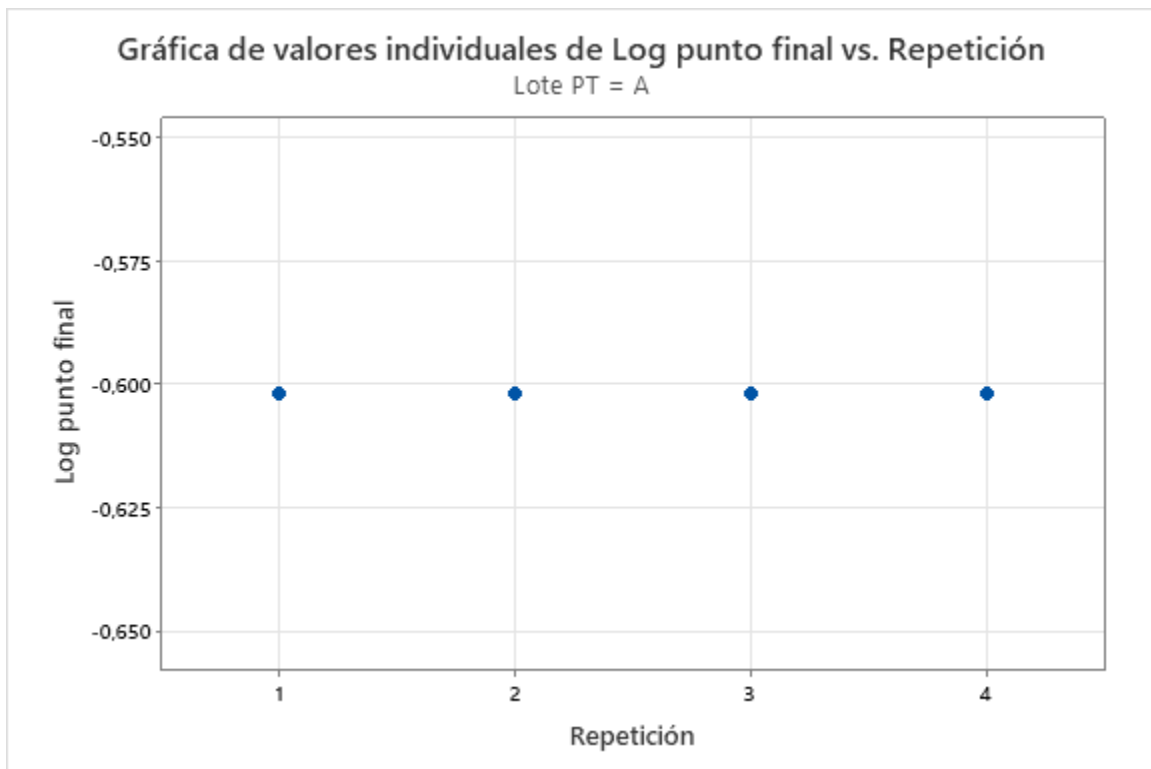
Estadísticas

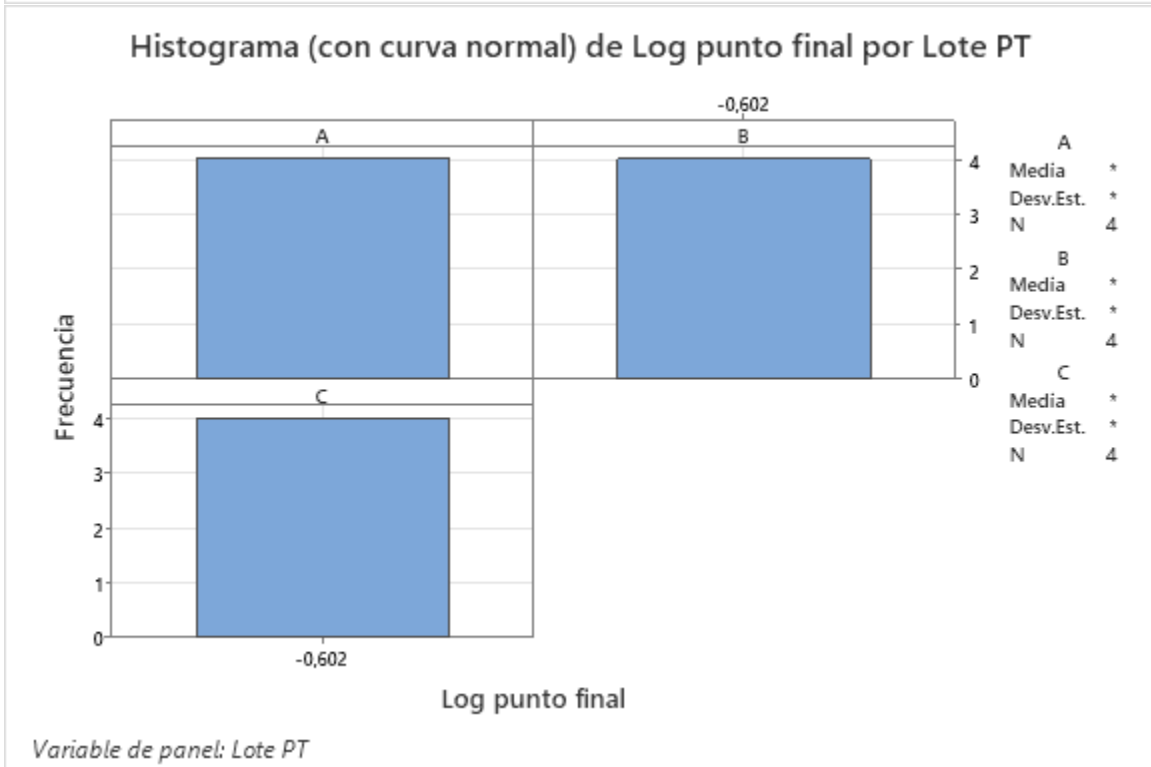
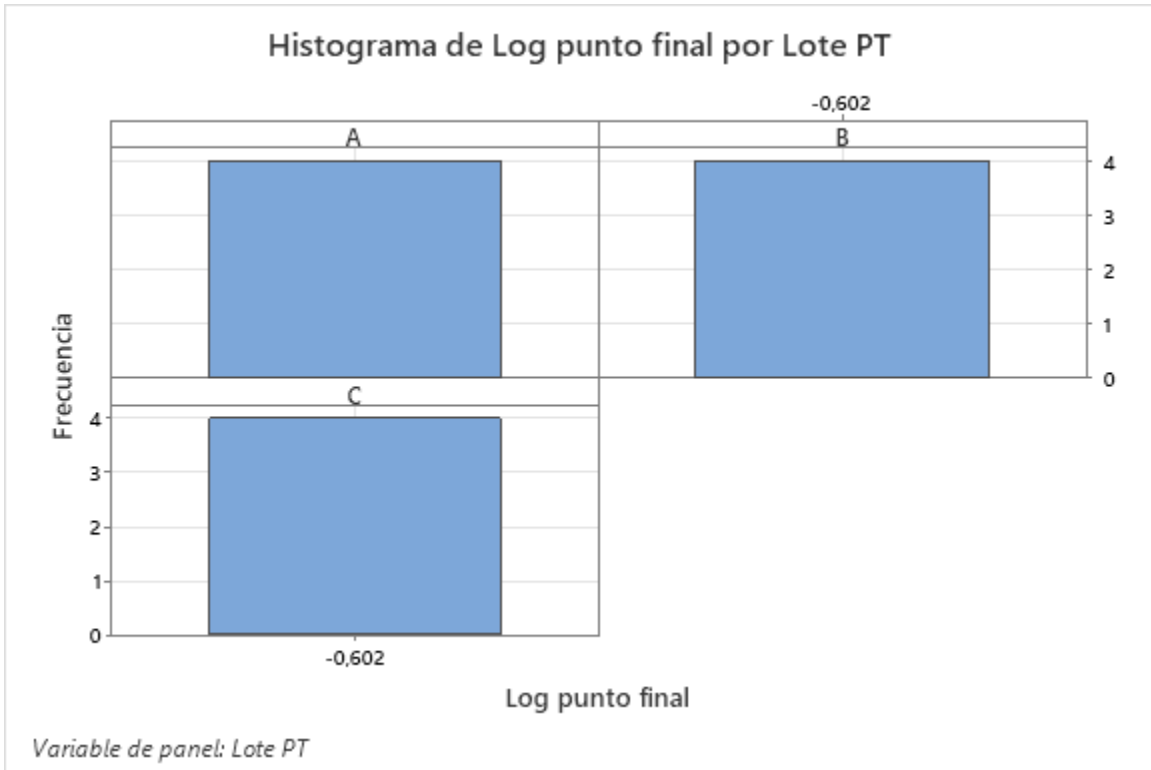
Variable	Repetición	N	N*	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.	Varianza	CoefVar
Log punto final	1	1	0	-0,60200		*	*	*
	2	1	0	-0,60200		*	*	*
	3	1	0	-0,60200		*	*	*
	4	1	0	-0,60200		*	*	*
Variable	Repetición	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo		
Log punto final	1	-0,60200	*	-0,60200	*	-0,60200		
	2	-0,60200	*	-0,60200	*	-0,60200		
	3	-0,60200	*	-0,60200	*	-0,60200		
	4	-0,60200	*	-0,60200	*	-0,60200		



* ERROR * No se puede producir un histograma con una curva normal para Log punto final.

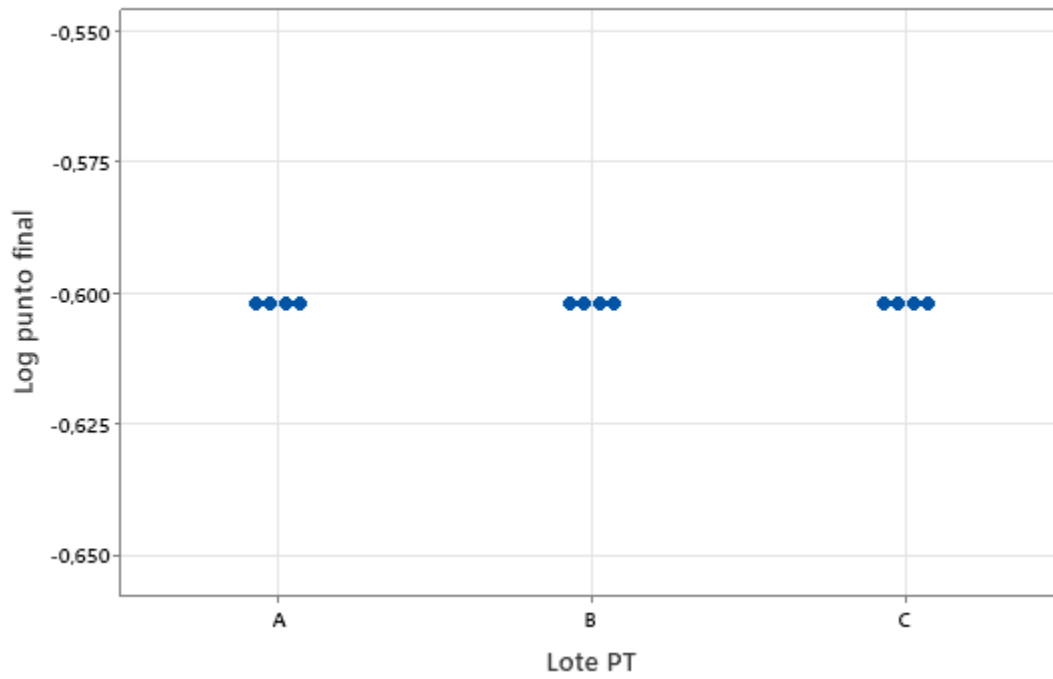
* ERROR * No hay suficientes datos.





* NOTA * La distribución no se pudo ajustar. El número de filas de datos distintas en Punto final (de Lote PT = A, B y C) debe ser mayor que o igual al número de parámetros de distribución estimados.

Gráfica de valores individuales de Log punto final vs. Lote PT



Gráfica de caja de Log punto final

