

# Inyectables III. Pirógenos

---

TEMA 12

*Calvo B, Esquisabel A, Hernández R, Igartua M*

Tecnología Farmacéutica: Formas Farmacéuticas. OCW 2015

Definición

Origen y naturaleza de los pirógenos

Características

Fuentes de pirógenos

Procedimientos de despirogenación

Control de pirógenos

Sustancias que inyectadas por vía parenteral son capaces de provocar un proceso febril en el paciente

Pueden producir reacciones más importantes (dolor de cabeza, taquicardia, disnea, mialgia, sepsis e incluso la muerte)

Suelen ser sustancias procedentes del metabolismo de microorganismos aunque también hay algunos que proceden de otras fuentes



## Endógeno

- Hormonas tiroideas, citoquinas, adrenalina

## Exógeno

- P.a. (anfotericina B, atropina, vancomicina), EDTA, partículas de sílice
- m.o.: levaduras, virus y bacterias (Gram+ y Gram-)

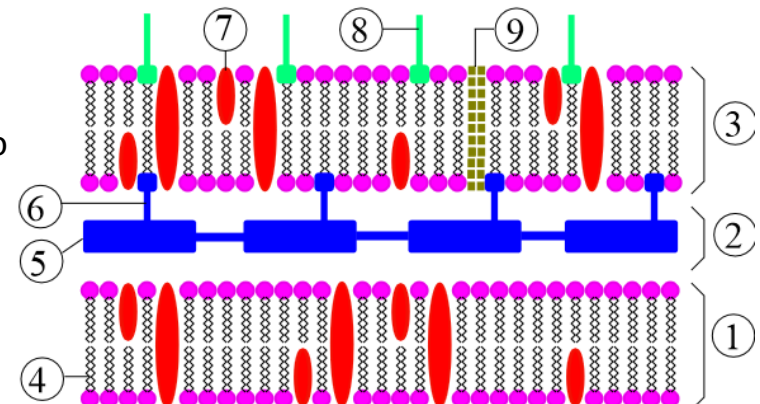
\*endotoxinas de bacterias **Gram -** : lipopolisacáridos (LPS) de la pared celular bacteriana

Actúan a dos niveles:

- directamente en el hipotálamo
- mediante la inducción de la síntesis de IL

## Bacteria gram –

1-membrana citoplasmática (membrana interna), 2-espacio periplasmático, 3-membrana externa, 4-fosfolípidos, 5-peptidoglicano, 6-lipoproteína, 7-proteínas, 8-lipopolisacáridos, 9-porinas



Franciscop2 , con Licencia Creative Commons con Atribución 3.0  
[http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria\\_Gram\\_negativa#/media/File:Bacteria\\_cell\\_wall2.svg](http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria_Gram_negativa#/media/File:Bacteria_cell_wall2.svg)  
 (consultada 25-05-2015)

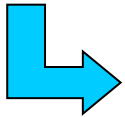
Termoestables (resisten esterilización en autoclave)

Pequeño tamaño (Pasan la mayoría de los filtros de 0,2  $\mu\text{m}$ )

Retenidos por filtros de profundidad y por sustancias adsorbentes

Sensibilidad según la especie:

$t^{\circ}$  de latencia hombre: 1 h  $\pm$  15 min



Más fácil prevenir los pirógenos que eliminarlos

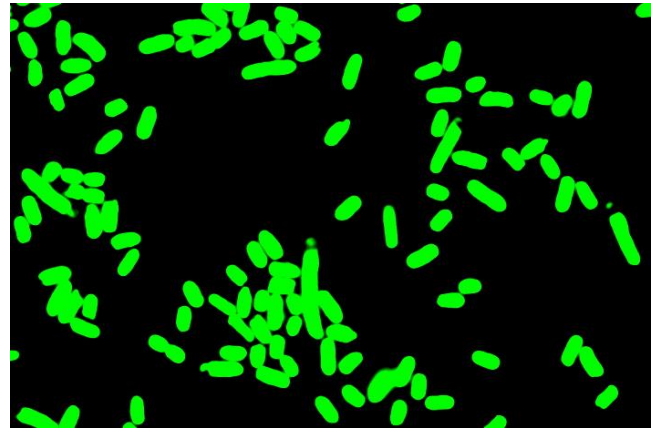
Disolvente (agua): PRINCIPAL FUENTE DE PIRÓGENOS

Sustancias disueltas (productos de origen biológico, glucosa, aa)

Material



Fuente: imágenes prediseñadas Office



Fuente: imágenes prediseñadas Office

No almacenar innecesariamente el agua

Conservar el agua en condiciones que eviten desarrollo de m.o.

Diseño canalizaciones: evitar estancamientos

Limpiar canalizaciones con antisépticos o vapor sobrecalentado

Utilizar reactivos libres de pirógenos

Lavar el material con ácidos o bases, enjuagar con agua apirogénica, calentar a  $t^a > 200^{\circ}\text{C}$

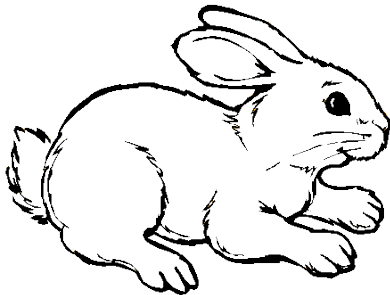
1. Destilación (agua libre de pirógenos)
2. Adsorción sobre carbón activo
  - Desventaja: alta afinidad por moléculas no-ionizadas de compuestos con elevado PM
3. Tratamiento con agentes oxidantes:  $H_2O_2$ , hipoclorito Na
4. Filtración:
  - Filtros en profundidad
  - Membranas de ultrafiltración porosidad: 0,2-0,002 mm
5. Calentamiento en medio ácido o alcalino:
  - HCl 0,1 N 30 min, 100 °C → inactiva LPS por hidrólisis
  - NaOH 0,1 N en etanol 95 % ó dimetilsulfóxido al 80 %  
→ saponificación del ácido graso del LPS
6. Calor seco:  $t^a > 250^{\circ}C$ , 30 min (vidrio, equipos metálicos)
7. Otros métodos: ósmosis inversa, técnicas cromatográficas, etc



## 1. Método basado en la medida del aumento de la T<sup>a</sup> rectal en conejos (Eur Ph, 2.6.8)

- universal
- Consiste en medir el aumento de temperatura corporal que provoca la administración intravenosa en conejos de una solución estéril de la sustancia a examinar

## 2. Ensayo de endotoxinas bacterianas : Método LAL (Limulus amoebocyte lysate coagulation method) (Eur Ph, 2.6.14)



Fuente: imágenes prediseñadas Office

Peso de los ratones > 1.5 kg

Ensayo preliminar :

- Administrar 0.9% NaCl libre de pirógenos
- Medir cambios en la temperatura del conejo desde los 90 min a 3 h tras la administración → < 0.6°C



## Ensayo principal:

- 3 conejos
- Calentar el producto a 38.5-39°C
- Inyección IV (0.5-10 mL/kg), lentamente en la vena marginal de la oreja

Medir la temperatura desde 90min hasta 3h tras la administración, a intervalos menores de 30 min.

Material estéril (calor seco a 250°C, 30 min)

Utilizar termómetros de alta precisión (0.1°C) para medir la  $T^a$  rectal.

Respuesta:  $T$  inicial -  $T$  máxima para cada ratón

sumar las diferencias del total de animales utilizados



## Interpretación de los resultados

N conejos	Material pasa si la suma de las respuestas no excede (°C)	Material NO CUMPLE si la suma de las respuestas excede (°C)
3	1.15	2.65
6	2.80	4.30
9	4.45	5.95
12	6.60	6.60

Si no se cumple el ensayo con 3 conejos, pero los valores entre las columnas 2 y 3 se debe repetir el test en un grupo adicional de 3 conejos, y así sucesivamente hasta un total de 4 grupos.

## Lisado de amebocitos



Fuente: imágenes prediseñadas Office

Limulus polyphemus.  
Cangrejo herradura

MUESTRA

(endotoxinas bacterianas)

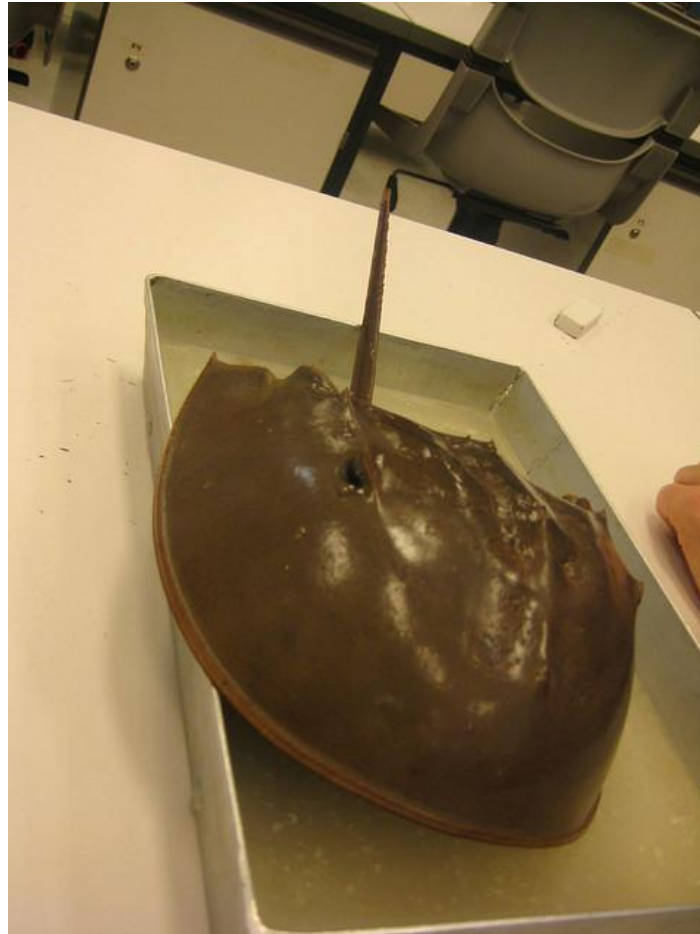


**Ensayo LAL: turbidimetrico / gel-clot / cromogenico**

**(turbidez) / (gellificación) / (color)**

- Control (-): agua LAL
- Control (+): solución estandar de endotoxina

## Cangrejo herradura



Tk-link Publicada en Flickr con licencia Creative Commons Genérica de Atribución/Compartir-Igual 4.0. <https://www.flickr.com/photos/tk-link/2058117592> (consultada el 14-04-2015)

Fácil de ajustar, ensayo *in vitro*

Específico de endotoxinas de bacterias Gram-

Para preparaciones en las que el ensayo de conejos no puede realizarse (radiofármacos, vacunas, productos obtenidos por biotecnología)

Método más utilizado en la actualidad

Debe ser validado para reemplazar al ensayo *in vivo*

Puede utilizarse como un ensayo límite : para determinar si la concentración está por debajo de los límites y no producirá una reacción pirogénica

**K:** límite de endotoxina que un paciente puede tolerar sin experimentar reacción adversa, en IU/kg peso y hora (monographs)

Vía de administración	K (endotoxin UI/kg h)
<b>IV</b>	5.0
<b>IV radiofármacos</b>	2.5
<b>Intratecal</b>	0.2



<https://www.youtube.com/watch?v=S3pyiJpIPe4>

<https://www.youtube.com/watch?NR=1&feature=endscreen&v=89jcQUwnC-8>