

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



PROPUESTA DE TRES PREFORMULACIONES DE UN PREPARADO
ALERGENICO POR VIA SUBLINGUAL UTILIZANDO COMO VEHICULOS
GLICERINA, PROPYLENGLICOL Y SORBITOL PARA PACIENTES
AMBULATORIOS DEL DEPARTAMENTO DE ALERGOLOGIA DEL HOSPITAL
NACIONAL ROSALES.

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:

BRENDA VERALINDA HERRERA LAINEZ
MARIO ERNESTO CERON

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL DE 2013.

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA.

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LOPEZ.

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS

FARMACEUTICOS, COSMETICOS Y VETERINARIOS.

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez.

ASESORA DE AREA DE INDUSTRIA FARMACEUTICA, COSMETICA Y

VETERINARIOS

Licda. Mercedes Rossana Brito.

DOCENTES DIRECTORES

Lic. Guillermo Antonio Castillo Ruiz.

Lic. Ana Cecilia Monterrosa

MSc. Amy Elieth Moran Rodríguez

Dr. Marlon Joel Ochoa Carabantes

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Señor Todopoderoso por la oportunidad recibida de cruzar la meta y llegar al término de mi carrera; en segundo lugar a mi madre Teresa de Jesús Laínez y a mi hermana Dollyana Herrera Laínez por sus consejos, apoyo y cuidados. A mi hijo Wilfredo Emanuel Peña Herrera por su paciencia y amor que han sido un pilar importante y motor para seguir adelante. En tercer lugar a mi padre José Eduardo Herrera por su apoyo y confianza en mí.

Agradezco especialmente a mis asesores de tesis MSc. Amy Elieth Moran, Licda. Ana Cecilia Monterrosa, Lic. Guillermo Antonio Castillo Ruiz y Dr. Marlon Joel Ochoa Carabantes por confiar en nuestro proyecto y orientarnos en este trabajo de graduación y finalmente a mis concejeras, concejeros, amigos y amigas que con sus palabras han sido de gran ayuda Dios les bendiga a todos.

Brenda Veralinda Herrera Laínez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al DIOS todo poderoso por permitirme de haber cumplido mi meta propuesta finalizar la carrera en Licenciatura en Química y Farmacia.

En segundo lugar agradezco de todo corazón a mi madre Elena Ceron a mi esposa Rosa Verónica Alemán por el inmenso apoyo que me dieron.

En tercer lugar un inmenso agradecimiento a mis asesores de tesis MSc. Amy Elieth Moran, Licda. Ana Cecilia Monterrosa, Lic. Guillermo Antonio Castillo y Dr. Marlon Joel Ochoa Carabantes, a todos ellos por su dedicación y esfuerzo en la realización de este trabajo de graduación.

A mis amigos y amigas que estuvieron cerca brindándonos su apoyo.

Muchas bendiciones a todos.

Mario Ernesto Cerón

ABREVIATURAS.

Abs: Absorbancia.

Agar XLD: agar xilosa lisina desoxicolato.

ATCC: American Type Culture Colection.

B: blanco.

BSA: Concentraciones teóricas de curva patrón.

CASOY: Caldo soya y caseína.

CENSALUD: Centro de Investigación y Desarrollo en Salud

°C: grados Celcius.

G: glicerina.

g: gramo(s).

mL: mililitro.

NaCl: cloruro de sodio.

P: propilenglicol.

Std: Estándar (es).

Sln: solución.

SSN: solución salina normal.

SR: solución reactiva.

S: sorbitol.

TSA: Agar tripticasa y soya.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonias por mililitros.

v/v: Solución volumen / volumen.

INDICE

3.0 MARCO TEORICO	25
3.1 HISTORIA	25
3.2 GENERALIDADES	26
3. 3 ALERGIA (HIPERSENSIBILIDAD)	27
3.4 MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA ALERGICA.	28
3. 5 ALERGENOS	30
3. 6 RESUMEN DE INMUNOTERAPIA ALERGENICA	32
3.7 MECANISMO DE ACCION DE LA INMUNOTERAPIA.	35
3.8 VACUNAS ALERGENICAS	37
3.9 TIPOS DE VACUNAS	38
3.10 LIQUIDOS ORALES	43
3.11 SOLUCIONES	44
3.12 CLASIFICACION DE LAS SOLUCIONES	44
3.13 FACTORES QUE DEBEN TOMARSE EN CUENTA EN LA PREPARACION DE SOLUCIONES.	45
3.14 VEHICULOS PARA PREPARACIONES LIQUIDAS	47
3.15 PRUEBAS FISICOQUIMICAS PARA DETERMINAR PROTEÍNAS	50

IV. DISEÑO METODOLOGICO	51
4.0. DISEÑO METODOLOGICO	52
4.1 TIPO DE ESTUDIO	52
4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA	52
4.3 INVESTIGACION DE CAMPO	53
4.4 PARTE EXPERIMENTAL	53
4.4.1 ANÁLISIS DEL ENVASE	53
4.4.2 ANALISIS DE MATERIA PRIMA	54
4.4.2.1 EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE LOS VEHÍCULOS DILUIDOS	56
4.4.2.1.1 IDONEIDAD DEL MÉTODO	56
4.4.2.1.2 LÍMITES MICROBIANOS PARA MATERIA PRIMA	59
4.4.2.1.3 PRUEBA PARA MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS PARA MATERIA PRIMA	60
4.4.3 PREPARACIÓN DEL PREPARADO ALERGÉNICO	64
4.4.3.1 PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE LOS ALÉRGENOS: POLVO Y ABEJA EN EL AREA ESPECIALIZADA DE VACUNAS ALERGÉNICAS	64
4.4.3.2 PREPARACIÓN DE LA VACUNA ALERGÉNICA	68
4.4.4 ANALISIS DE PRODUCTO TERMINADO	71

4.4.4.1. CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO	71
4.4.4.1.1 IDONEIDAD DEL MÉTODO Y LÍMITES MICROBIANOS PARA PRODUCTO TERMINADO	71
4.4.4.1.2 PRUEBAS DE ESTABILIDAD PARA PREFORMULACIONES DE PREPARADOS ALERGÉNICOS	. 72
5.0 RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	76
6.0 CONCLUSIONES	101
7.0 RECOMENDACIONES	104

INDICE DE ANEXOS

ANEXO No.

1. Certificados de materias primas.
2. Monografías de materias primas.
3. Esquemas de procedimientos de análisis microbiológicos.
4. Esquema de preparación de vacunas alergénicas.
5. Preparación del preparado alergénico frasco N° 1 y N° 14 de cada alérgeno.
6. Cálculo de concentración teórica de los preparados alergénicos frascos N° 1 y N° 14.
7. Cálculo de concentración práctica de los preparados alergénicos.
8. Materiales, equipo, medios de cultivo y reactivos.

INDICE DE TABLAS

Tabla N°:

1. Condiciones de cultivo para la preparación de Inóculos	57
2: Características morfológicas de <i>Staphylococcus aureus</i> en medio agar selectivo	61
3: Características morfológicas de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en medio agar selectivo y de diagnóstico	61
4. Características Morfológicas de <i>Salmonella spp</i> en medio agar selectivo	63
5. Características Morfológicas de <i>Escherichia coli</i> en medio agarMacConkey	63
6: Propiedades físicas de los vehículos al 50%	76
7: Resultados de análisis de prueba preparatoria para los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol en soluciones al 50% v/v	77
8: Resultados de análisis de materia prima	80
9: Idoneidad del método para producto terminado	81
10. Resultados de análisis microbiológicos del preparado alergénico.Día 0	84
11. Resultados de análisis del preparado alergénico.Día 7	85
12. Resultados de análisis del preparado alergénico.Día 14	86

13. Resultados de análisis del preparado alergénico. Día 21	88
14: Resultados de análisis del preparado alergénico. Día 30	90
15: Absorbancias de las soluciones estándar leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm	91
16: Absorbancias de materias primas leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm	92
17: Datos de concentraciones teóricas para alérgenos de abeja y polvo en los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol al 50%	93
18: Absorbancias de las soluciones estándar leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm	94
19: Datos de concentraciones prácticas para alérgenos de abeja y polvo en los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol al 50%v/v para los días: 0, 7,14, 21 y 30	95

INDICE DE FIGURAS

Figura N°:		
1: Síntesis de inmunoglobulina E (IgE)		36
2: Esquema de fabricación y análisis de materia prima y preparados alergénicos		54
3: Preparación de vehículos al 50% v/v realizado dentro de la cabina de flujo laminar horizontal en el área de vacunas alergénicas del Hospital Nacional Rosales		55
4: Frascos de alérgeno de polvo 1:5 y Abeja 1.10		64
5: Diluciones para alérgeno de abeja en los vehículos glicerina, sorbitol y propilenglicol		67
6: Diluciones para alérgeno de polvo en los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol		68
7: Frascos de preparados alergénicos (producto terminado)		70
8: Soluciones estándar de Albúmina de bobino para realizar curvapatrón		74
9: Placa con crecimiento de <i>Escherichia coli</i>		78
10: Placa con crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i>		79
11: Placa con crecimiento <i>Salmonella typhimorium</i>		79
12: Placa con crecimiento de <i>Pseudomona aeruginosa</i>		79

13: Grafica de las soluciones estándar de albumina a una longitud de 545 nm	Deonda	95
14: Gráficas de preparados alergénicos de abeja en glicerina frascos N° 1 y N° 14 (AG1 y AG14)		97
15: Gráficas de preparados alergénicos de polvo en glicerina frascos N° 1 y N° 14 (PG1 y PG14)		97
16: Gráficas de preparados alergénicos de abeja en propilenglicol frascos N° 1 y N° 14 (AP1 y AP14)		98
17: Gráficas de preparados alergénicos de polvo en propilenglicol frascos N° 1 y N° 14 (PP1 y PP14)		98
18: Gráficas de preparados alergénicos de abeja en sorbitol frascos N° 1 y N° 14 (AS1 y AS14)		99
19: Gráficas de preparados alergénicos de polvo en sorbitol frascos N° 1 y N° 14 (PS1 y PS14)		99
20: Preparación de inóculos para: <i>Escherichia coli</i> , <i>pseudomona aeruginosa</i> , <i>Salmonellatyphimorium</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>		130
21: Idoneidad del método: Contaminación de materia prima		131
22: Límites microbianos de materia prima		132
23: Límites microbianos: Materia prima		133

24: Prueba para determinar ausencia de <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhimorium</i>	134
25: Prueba para determinar ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona aeruginosa</i>	135
26: Preparación de frasco de preparado alérgico frasco N° 1 de abeja y polvo	141
27: Preparación de frasco de preparado alérgico frasco.. N° 14 de abeja y polvo	142
28: Esquema de diluciones para alérgeno de abeja	144
29: Esquema de diluciones para alérgeno de polvo	146

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°

1: PREPARACIÓN DE VACUNA ALERGÉNICA PARA ALÉRGENO DE ABEJA 1:10	70
2: PREPARACIÓN DE VACUNA ALERGÉNICA PARA ALÉRGENO DE POLVO 1:5	71
3. PREPARACION DE VACUNA ALERGENICA FORMA TRADICIONAL	137
4: PREPARACION DE VACUNA ALERGENICA PARA ALERGENO ABEJA 1:10	138
5: PREPARACION DE VACUNA ALERGENICA PARA ALERGENO POLVO 1:5.	139

RESUMEN.

El Hospital Nacional Rosales brinda atención especializada para el tratamiento de la inmunoterapia alérgica, preparando y dispensando la vacuna o preparado alérgico, dándose el fenómeno de que cada año se incrementa la demanda de pacientes que necesitan esta vacuna, por lo que el vehículo usado para su preparación (Solución de EVANS) es insuficiente, lo que limita la preparación y dispensación de esta, esto da como consecuencia la interrupción y el inicio de los tratamientos sin obtener mejoría en la población y elevar los costos.

Tomando como base lo expuesto, realizamos una propuesta para mantener los tratamientos de la inmunoterapia alérgica, aplicados actualmente, que incluya un nuevo vehículo en la elaboración del preparado alérgico que se administre por vía sublingual, desarrollando una minuciosa investigación bibliográfica de los posibles vehículos a utilizar, seleccionando tres: glicerina, propilenglicol y sorbitol sometidos a diferentes análisis físico-químicos y microbiológicos, para sustituir la Solución de EVANS. Este proceso se desarrolló en tres fases:

Primera fase: Análisis de materia prima y envases.

A los frascos se les realizó el proceso de autoclave para esterilizarlos.

De la materia prima se adquirieron los certificados de calidad por ello no se determinó la prueba de identificación, pero se realizaron los controles microbiológico y físico químico según lo especificado en los libros oficiales.

Segunda fase: Elaboración del preparado alergénico.

Preparamos diluciones de los alérgenos de polvo y abeja en el área de vacunas alergénicas del Hospital Nacional Rosales que cuenta con una cabina de flujo laminar horizontal y tomamos los frascos de preparados alergénicos N° 1 y N° 14 de cada alérgeno en estudio como muestra representativa.

Tercera fase: Determinación de calidad y estabilidad de los preparados alergénicos llevando un análisis físico-químico y control microbiológico.

A los preparados alergénicos les practicamos controles microbiológicos y análisis físico-químico similar al de la materia prima por un lapso de un mes con intervalos de tiempo de siete días durante los meses de Junio y Julio del año 2011.

Los resultados obtenidos tanto para materia prima como para los productos terminados fueron satisfactorios porque se demostró que cumplen con lo especificado en la farmacopea dando límites microbianos aceptables para el consumo humano y que los vehículos no degradan la proteína del alérgeno durante su manipulación en la investigación.

Finalmente concluimos que los vehículos: glicerina, propilenglicol y sorbitol son un sustituto para la solución de EVANS en la preparación de los preparados alergénicos utilizados por vía sublingual y recomendamos hacer estudios clínicos en pacientes ambulatorios del Departamento de Alergología del Hospital Nacional Rosales.

I. INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

La historia de la inmunoterapia alérgeno específica (vacunas alérgicas) se remonta a los primeros años del siglo XX teniendo de base la vacunación contra agentes infecciosos. Han pasado 181 años desde que Jenner descubriera las propiedades de la vacuna como preventivo. A partir de él, las inmunizaciones forman parte de la historia de la humanidad, abriendo camino al pensamiento científico hacia la prevención y erradicación de muchas enfermedades al surgir y contar con las primeras vacunas. (2, 6)

En la actualidad el país cuenta con un amplio rango de vacunas preventivas de muchas enfermedades infecto-contagiosas en toda la red del Sistema Público de Salud así como con las vacunas alérgicas (inmunoterapia alérgeno específica) en centros de tercer nivel.

El Hospital Nacional Rosales, cuenta con casi todas las especialidades médicas dentro de las cuales se encuentra la especialidad de Alergia e Inmunología; por ser el principal centro de atención especializada en el país, se concentran pacientes de todas partes del país para dicha área, que necesitan tratamiento de inmunoterapia con vacuna alérgica. Además, es uno de los tres centros de atención de la red pública que cuenta con la elaboración y dispensación de los preparados alérgicos para pacientes adultos; así como también el Hospital San Juan de Dios de San Miguel y pacientes referidos del Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom (HNBB); con lo que se incrementa cada año la demanda de pacientes. A pesar de contar con los insumos para la preparación de la

inmunoterapia alérgeno específica subcutánea (ITSC) no se cuenta con los recursos económicos para estar a la vanguardia con modalidades emergentes igualmente efectivas de tratamiento desensibilizante (inmunoterapia alérgeno específica sublingual), menos invasiva, con menos reportes de reacciones adversas y mayor adhesividad de los pacientes a su tratamiento, debido al notable incremento de los costos por cada tratamiento con la adquisición del vehículo sublingual comercializado en el país.

Una propuesta de solución para mantener los tratamientos de inmunoterapia activos, es la inclusión de un nuevo vehículo utilizando en su preformulación: Glicerina, Sorbitol y Propilenglicol tomando como muestras los alérgenos de: Polvo y Abeja; por lo que se promueve el cambio de la preparación de vacunas alérgicas por vía subcutánea a tres preparados alérgicos por vía sublingual, a los que se les realizarán pruebas Físico-químicas, Microbiológicas y de Estabilidad.

La elaboración del preparado alérgico se realizó en el área de vacunas alérgicas del departamento de Farmacia del Hospital Nacional Rosales en el mes de junio de 2011; el análisis microbiológico y de estabilidad en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador en los meses de junio y julio de 2011.

II. OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS.

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Proponer tres preformulaciones de un preparado alergénico por vía sublingual utilizando como vehículos: Glicerina, Propilenglicol y Sorbitol, para pacientes ambulatorios del departamento de Alergología del Hospital Nacional Rosales.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 2.2.1 Evaluar la calidad microbiológica de los vehículos: Glicerina, Propilenglicol y Sorbitol, a utilizar para la preparación de las preformulaciones alergénicas.
- 2.2.2 Elaborar los preparados alergénicos a base de polvo y abeja, utilizando el esquema de dosificación propuesto.
- 2.2.3 Determinar la estabilidad física y química de las diferentes preformulaciones de las vacunas alergénicas en los vehículos utilizados frente a los alérgenos en condiciones de preparación para utilizarse por vía sublingual.
- 2.2.4 Evaluar la estabilidad microbiológica de las diferentes preformulaciones de las vacunas alergénicas preparadas en un preparado alergénico por vía sublingual.
- 2.2.5 Dar a conocer los resultados de la investigación al departamento de Alergia e Inmunología del Hospital Nacional Rosales.

III. MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO.

3.1 HISTORIA.

Ochoa, MJ. 2007. “Establecer bases de un plan nacional de atención integral de enfermedades alérgicas en coordinación con el Hospital de Niños Benjamín Bloom y demás centros de salud de la red pública nacional bajo la dirección del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (MSPAS)”, Hospital Nacional Rosales, (proyecto de trabajo escrito). En El Salvador, la inmunoterapia se remonta al año 1956. En 1982 se cierra el servicio de Alergia.

Pasaron 22 años para que el Hospital Rosales volviera a abrir el Servicio de Alergia, el 20 de octubre de 2003.

Desde ese momento el Servicio empezó a crecer y la especialidad a ser demandada.

En febrero de 2006 se incorpora el alergólogo Dr. Marlon Joel Ochoa Carabantes al Servicio de Alergia del Hospital Rosales quien tomó la iniciativa de realizar este trabajo de investigación.

El Hospital Nacional Rosales es el principal centro de atención y referencia a nivel nacional, el único de la red pública que atiende adultos que cuenta con servicio de Alergia, que da seguimiento a los pacientes dados de alta del servicio de Alergia del Hospital Nacional Bloom en su mayoría adolescentes y que además absorbe las referencias de otras especialidades afines de la institución (otorrinolaringología, neumología y dermatología).

3.2 GENERALIDADES

MEDICAMENTOS ESPECIALES ⁽¹⁸⁾.

Dentro de la clasificación de los medicamentos especiales; los medicamentos inmunológicos se definen como productos terapéuticos consistentes en vacunas, toxinas, sueros y alérgenos. Los productos alérgenos comprenden cualquier medicamento destinado a detectar o provocar una alteración adquirida y específica en la respuesta inmunológica a un agente alergenizante.

La presentación de los medicamentos alérgenos varían según el tipo de inmunoterapia que se vaya a emplear en el tratamiento de la enfermedad alérgica y en función de su vía de administración utilizada: formas farmacéuticas de los extractos alérgenos:

- Soluciones inyectables.
- Suspensiones inyectables.
- Soluciones sublinguales o nasales
- Comprimidos y cápsulas
- Polvos o liofilizados
- Parches

Una de las principales particularidades de la inmunoterapia alérgeno-específica es su carácter individual. Las vacunas son individualizadas y preparadas con agentes inmunizantes a concentración y dilución específica correspondiente a su prescripción facultativa para un paciente determinado. Hoy en día existen distintos tipos de inmunoterapia y diferentes productos, pero muchos de ellos se

encuentran actualmente en fase de investigación en estudios clínicos que aún no han sido aprobados para el tratamiento de la enfermedad alérgica. .

3. 3 ALERGIA (HIPERSENSIBILIDAD)⁽¹⁵⁾.

Puede definirse como una reacción inmunitaria indeseable a un inmunógeno ambiental, conocido con el nombre de: ALERGENO. Este fenómeno no refleja una simple relación causa-efecto, dado que la exposición a un alérgeno conduce al desarrollo de enfermedad en un grupo de personas, la enfermedad alérgica está determinada por las características individuales, las del alérgeno y las condiciones de exposición.

La alergia se produce solo en personas previamente sensibilizadas por la exposición al alérgeno y la capacidad de adquirir sensibilización de éste, ya sea por factores genéticos, edad, naturaleza del alérgeno.

Los procesos inmunitarios de la alergia traen como consecuencia la inflamación y el daño tisular. La mayoría de las alergias está mediada por anticuerpos IgE.

(6, 15).

La Organización Mundial de la Salud acepta como enfermedades alérgicas la rinitis, sinusitis, asma, neumonitis de hipersensibilidad, conjuntivitis, urticaria, eczema, dermatitis de contacto, choque anafiláctico, angioedema y algunos trastornos gastrointestinales mediados por la IgE ⁽¹⁵⁾.

3.4 MECANISMOS IMPLICADOS EN LA RESPUESTA ALERGICA. (4, 19)

La respuesta alérgica requiere una fase previa de sensibilización durante la cual el sujeto desarrolla anticuerpos de tipo inmunoglobulina E (IgE) frente a un determinado alérgeno. Durante esa fase, las células Th2-CD4+ producen citocinas como la interleucina 4 (IL-4) y la IL-3, lo que conlleva la producción de IgE por parte de las células B, y además favorece la producción de moco, la activación de las células endoteliales y la migración de los eosinófilos a los tejidos.

La IgE específica generada se une a los receptores de alta afinidad en mastocitos y basófilos y tras contactos posteriores con el alérgeno se produce su degranulación lo que lleva a la liberación de mediadores responsables de la fase inflamatoria aguda. Esta primera reacción se sigue posteriormente de una fase tardía, cuyos principales responsables son las células Th₂ CD4+, caracterizadas por la producción de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (éstas estimulan la producción y activación de las células B), eosinófilos, neutrófilos y basófilos con lo cual puede haber un daño tisular. Varios de ellos frenan los LTh₁ por lo cual éstas no logran producir Interferón- γ (IFN- γ) que podría frenar en parte los LTh₂). En esta fase crónica hay una serie de hechos encadenados: activación de linfocitos T, desplazamiento selectivo hacia el órgano o los órganos de choque con su consiguiente reactivación y desarrollo de sus funciones

efectoras. Todos los efectos patológicos requieren de la activación de células T que se pueden desencadenar por la interacción con aeroalérgenos alimentarios.

El diagnóstico de una enfermedad alérgica requiere en primer lugar establecer la etiología y la identificación de los alérgenos específicos.

Un diagnóstico físico no es suficiente para establecer la etiología de la alergia, dado que los síntomas de tipo alérgico pueden ser provocados por otras causas.

El interrogatorio minucioso permite establecer el entorno e identificar posibles alérgenos.

Las pruebas de sensibilidad con extractos alergénicos Prick Test son el método principal para identificar una etiología alérgica específica.

Prick test ⁽¹⁶⁾: esta prueba permite determinar cuál es el posible alérgeno responsable del desencadenamiento de las manifestaciones alérgicas. Por medio de excoriación en la piel utilizando una lanceta, se aplican extractos preparados a base de los alérgenos que se van a estudiar.

En la prueba positiva aparece una reacción de eritema y pápula en 10 a 20 minutos. La prueba se puede hacer simultáneamente para varios alérgenos, inoculándolos en lugares diferentes del antebrazo.

Una vez identificado la etiología y los alérgenos específicos requiere de un tratamiento:

- Controles ambientales: tienen la finalidad de minimizar el riesgo de exposición al alérgeno.

- La inmunoterapia.
- Tratamiento farmacológico sintomático. (6)

3. 5 ALERGENOS (4)

Los alérgenos son las sustancias causantes de las enfermedades alérgicas. Estos como principio activos pueden definirse como proteínas o glicoproteínas capaces de inducir una reacción alérgica mediada por la IgE (6, 18). Pueden ser de origen muy diverso, por ejemplo ácaros, pólenes, esporas de hongos, epitelio de animales domésticos, alimentos, bacteria, látex y fármacos.

La investigación en el campo de la alergología tiene sus complicaciones y problemas específicos. No todas las moléculas alergénicas están presentes en grandes cantidades en la fuente de la que proceden. Este hecho dificulta enormemente el trabajo de investigación en el campo de la alergología y, en especial, en el estudio de los alérgenos. Por otra parte el hecho de que el reconocimiento de los alérgenos por parte de los pacientes no sea homogéneo y que el origen de la alergia no resida en el defecto de un solo gen, complica aún más su estudio.

Actualmente existe un gran número de alérgenos bien caracterizados; de algunos se conoce la secuencia de aminoácidos, parcial o completa y de otros la del ADN copia. Un alérgeno no tiene por qué ser una especie molecular única, sino que en muchos casos dentro de esta denominación puede haber moléculas de secuencia casi idénticas. Las propiedades bioquímicas de

algunos alérgenos juegan un papel importante en el desequilibrio del sistema inmunológico; algunos alérgenos poseen actividad enzimática.

El sistema inmune produce otro tipo particular de proteínas, los anticuerpos, capaces de distinguir a las moléculas propias de las ajenas ⁽¹⁰⁾

EXTRACTO ALERGENICO: Es una preparación de un alérgeno obtenido mediante extracción de los constituyentes activos de sustancias animales o vegetales en un medio adecuado.

Los extractos alérgicos son soluciones o suspensiones concentradas de alérgenos que se utilizan para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades alérgicas. La mayoría de estos preparados son productos inyectables que se administran en el consultorio del médico.

Los extractos alérgicos por lo general se dividen en *acuosos o glicerinados*. Los primeros están diluidos en solución salina normal o en una solución electrolítica isotónica similar; los últimos son diluidos con soluciones que contienen un 50% de glicerina.

PRODUCTO ALERGENICO: Producto biológico, incluyendo extractos alérgicos y otros que es administrado al hombre para el diagnóstico, prevención y tratamiento de las enfermedades alérgicas.

La farmacopea Europea define producto alérgico: aquellos preparados farmacéuticos que derivan de vacunas de materiales existentes en la naturaleza que contienen alérgenos y que son sustancias causantes y/o provocan enfermedad alérgica.

Los componentes alergénicos son, en su mayoría, de naturaleza proteica; por lo que pueden ser identificados por métodos cualitativos y cuantitativos como por ejemplo: la prueba de Biuret y Electroforesis en Gel de Poliacrilamida. Los productos alergénicos están destinados para el diagnóstico in vivo y/o tratamiento de las enfermedades de hipersensibilidad alérgica atribuidos a estos alérgenos.

El comité de Ginebra decidió el uso del término “Vacuna Alergénica” más que extracto alergénico, para indicar que las vacunas (extractos alergénicos) modifican o regulan la respuesta inmune de las enfermedades alérgicas y son tratamientos que se están desarrollando y utilizando actualmente para el tratamiento de otras enfermedades inmunológicas e infecciosas (1).

3. 6 RESUMEN DE INMUNOTERAPIA ALERGENICA.

La inmunoterapia con alérgenos ha sido usada desde principios de siglo XX principalmente en forma acuosa, a pesar de haber sido usada de forma empírica durante muchos años demostró ser eficaz para tratar enfermedades alérgicas.

La inmunoterapia con alérgenos consiste en administrar cantidades gradualmente crecientes de un extracto alergénico a un sujeto alérgico para mejorar sintomatología causada por la exposición posterior al alérgeno causante. (4)

Las vacunas se utilizan en medicina como modificadores de la respuesta inmunológica. Así también sucede con la inmunoterapia con alérgenos.

Los importantes avances en el campo de la alergología han permitido introducir nuevas formas de tratamiento de las afecciones alérgicas y el conocimiento de desencadenantes de estas patologías (alérgenos) y los mecanismos implicados en las respuestas alérgicas (1).

La alergia puede definirse también, como una reacción inmunitaria indeseable a un inmunógeno ambiental, conocido con el nombre de *alérgeno*, este fenómeno no refleja una simple relación causa-efecto, dado que la exposición a un alérgeno conduce al desarrollo de enfermedad solo en subgrupos de personas. La alergia se produce sólo en personas previamente sensibilizadas por la exposición al alérgeno y la capacidad de adquirir sensibilización está determinada, al menos en ciertos casos, por factores genéticos (atópicos), (La persona atópica a menudo refiere una historia familiar de alergia y por lo general es alérgico a múltiples alérgenos).

La enfermedad alérgica está determinada por las características individuales, las del alérgeno y las condiciones de exposición. La sensibilización también depende de la edad del individuo, de la naturaleza del alérgeno, de la vía y el grado de exposición y de muchos otros factores (6).

En la actualidad se intenta explicar las posibles razones responsables de la prevalencia de las enfermedades alérgicas:

- Causa posible de higiene (menor contacto con gérmenes).

- Cambios en la flora intestinal.
- Menor contacto con endotoxinas en el ambiente a edades tempranas.
- Falta de ejercicio.
- Urbanización de las poblaciones.
- Contacto con mayores concentraciones de alérgenos.
- Introducción de nuevos alérgenos alimentarios (especialmente frutas exóticas)

Ninguno de los factores anteriores sirve para explicar por sí solo el incremento significativo de las enfermedades alérgicas; sin embargo, lo que se ha demostrado es que la exposición a altos niveles de alérgenos durante la infancia y una predisposición genética familiar a padecer enfermedades alérgicas son factores de riesgo importantes para la sensibilización y desarrollo de la sintomatología alérgica, por lo que es importante tener en cuenta un diagnóstico y una intervención precoz desde diversos puntos de vista:

1. Asegurando el diagnóstico etiológico de los síntomas.
2. Evitando la evolución de la enfermedad por medio de la administración del tratamiento necesario.
3. La inmunoterapia debería iniciarse una vez diagnosticada la enfermedad alérgica, desde su fase más temprana y sin esperar que aparezcan síntomas secundarios (evolución espontánea)

La falta de diagnóstico específico precoz es muy importante del punto de vista del éxito de un tratamiento como la inmunoterapia, ya que con el tiempo el

paciente puede ir adquiriendo nuevas sensibilizaciones, lo cual complica enormemente la selección de los alérgenos en la vacuna y puede producir las posibilidades de éxito de la misma.

La inmunoterapia con vacunas alérgicas es el único tratamiento que puede alterar el curso natural de las enfermedades alérgicas. Se está investigando actualmente nuevas vías de administración de la inmunoterapia: inmunoterapia nasal, sublingual u oral que pueden llegar a ser unas vías de administración igual de eficaces, sencillas y seguras. (1)

3.7 MECANISMO DE ACCION DE LA INMUNOTERAPIA.^(1, 15)

Las principales características de la inflamación alérgica en el hombre son la activación de los mastocitos y basófilos dependiente de la IgE y la eosinofilia tisular, en la cual las citocinas desempeñan un papel principal al producirse la interacción del alérgeno con las moléculas de IgE antígeno-específico unidas a los receptores de alta afinidad de los macrófagos, se inicia la cascada de fenómenos desencadenantes de la reacción de hipersensibilidad inmediata que es la directamente responsable del desarrollo de la enfermedad alérgica.

Tras la presentación y reconocimiento positivo del antígeno por el sistema mayor de Histocompatibilidad del paciente alérgico, se activa una célula Th₂ productora de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 y factor estimulante de las colonias de Granulocitos y macrófagos, siendo por ello una célula que colabora activamente en la síntesis de IgE. (ver fig. 1).

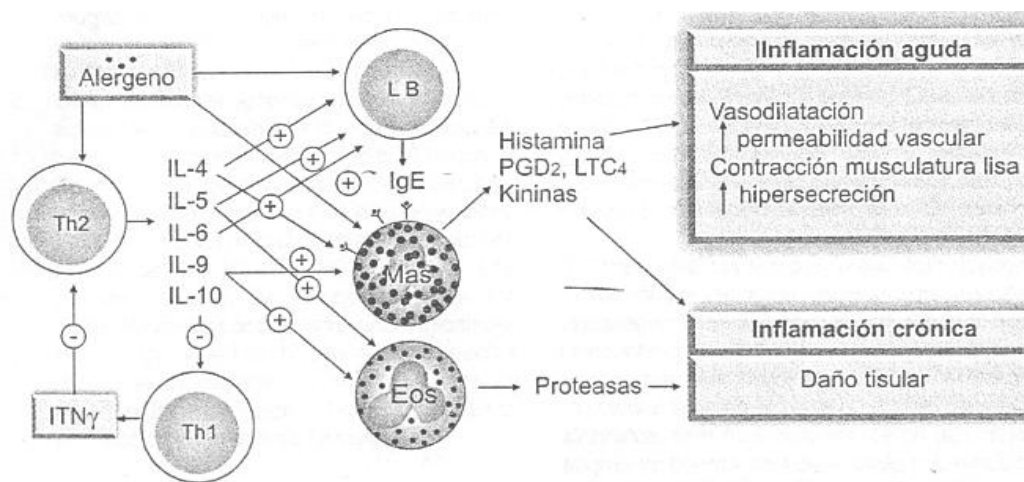


Figura Nº 1: Síntesis de inmunoglobulina E (IgE).

Las células T activadas y sus productos juegan un papel primordial en la patogénesis de las enfermedades alérgicas. El fenotipo Th₂ [citocinas IL-4, IL-5] se asocia con las enfermedades alérgicas mientras que el fenotipo Th₁ [citocinas IL-10, IFN- γ] se asocia a la protección frente a las enfermedades alérgicas. Por este motivo una de las metas de la inmunoterapia sería reorientar la respuesta de las células T hacia el patrón Th₁. De hecho, varios trabajos han correlacionado el éxito de la inmunoterapia con una inducción de la respuesta Th₁ y una disminución en la producción de citoquinas Th₂. Últimamente se han descrito otras células T, con funciones y perfiles de citoquinas diferentes de las células T helper. Estas células, denominadas células T reguladoras tienen la capacidad de regular a la baja tanto la respuesta Th₁ como la respuesta Th₂ a través de la producción de IL-10. Tanto los individuos sanos como los alérgicos

tienen los tres tipos de células, pero en proporciones diferentes. En las personas sanas la población celular específica predominante es del tipo T reguladora mientras que en las personas alérgicas predomina el tipo Th₂. Hay estudios que demuestran que en los pacientes con buena respuesta clínica a la inmunoterapia subcutánea la población predominante llega a ser de tipo regulador. Sin embargo, por el momento no se ha comprobado ningún efecto sobre las células T reguladoras cuando se utiliza la inmunoterapia sublingual, aunque existen indicios de que sí ocurren.

En la inmunoterapia sublingual el alérgeno es captado localmente por las células dendríticas tipo Langerhans, que a nivel de la mucosa oral expresan, de forma natural, receptores de alta y de baja afinidad para la IgE y producen IL-10 y por consiguiente actúan sobre la producción de células T. El hecho de que la inmunoterapia sublingual precisa, para ser eficaz, que el extracto sea deglutido indica que el sistema inmunológico del aparato digestivo también juega un papel relevante en los efectos de la inmunoterapia sublingual. Se necesitan nuevos trabajos para aclarar todas estas ambigüedades.

3.8 VACUNAS ALERGENICAS ⁽¹⁾.

Los médicos prescriben las vacunas alérgicas para inmunoterapia en los pacientes con enfermedad alérgica demostrada. Cuando un paciente presenta múltiples sensibilidades debido a: alérgenos relacionados, y no relacionados, se puede prescribir una vacuna que contenga la mezcla de todos ellos.

Inmunoterapia como tratamiento curativo. (1)

El tratamiento de las enfermedades alérgicas combina el tratamiento farmacológico e inmunológico. En muchos pacientes los fármacos pueden aliviar los síntomas sin provocar efectos adversos. Los fármacos proporcionan un tratamiento sintomático, mientras que la evitación del alérgeno y la inmunoterapia son las únicas modalidades terapéuticas que tienen la posibilidad de modificar el curso natural de la enfermedad.

El objetivo principal en el tratamiento inmunológico son a corto plazo: reducir las respuestas a los desencadenantes alérgicos que precipitan los síntomas y en ocasiones disminuir la respuesta inflamatoria e impedir el desarrollo de una enfermedad persistente.

Inmunoterapia como tratamiento preventivo. (1)

En la actualidad la evitación del alérgeno y la inmunoterapia son los únicos tratamientos que modifican el curso de una enfermedad alérgica ya sea previniendo el desarrollo de nuevas sensibilizaciones o alterando la historia natural de la enfermedad o su progresión.

3.9 TIPOS DE VACUNAS (1)

Pueden ser de dos tipos según: vía o época de administración.

Vía de administración

Actualmente se utilizan dos tipos de tratamientos: la inmunoterapia subcutánea y la inmunoterapia sublingual.

Inmunoterapia subcutánea (1)

El *extracto* se administra por vía subcutánea, en dosis seriadas, crecientes, generalmente semanales, según una pauta preestablecida por el fabricante o por el alergólogo (fase de iniciación), hasta llegar a la dosis máxima o de mantenimiento, que se repite de forma mensual (fase de mantenimiento).

Según la pauta utilizada para alcanzar la dosis de mantenimiento distinguimos pauta clásica o convencional y pautas rápidas. La pauta convencional es la única que puede administrarse desde las primeras dosis en los Centros de Atención Primaria. Se administra una dosis a la semana y la dosis de mantenimiento se alcanza en un período variable, generalmente de 10 a 12 semanas. En las pautas rápidas el tiempo de la fase de iniciación se reduce, pero el paciente no llega a Atención Primaria hasta que ha alcanzado la fase de mantenimiento. Las dosis anteriores se habrán administrado en los Servicios de Alergia.

Distinguimos dos tipos de pautas rápidas, la agrupada o clúster en que se administran más de una dosis al día, un día a la semana y la pauta Rush o ultrarrápida en que se administran varias dosis al día, varios días seguidos.

Reacciones adversas de la inmunoterapia subcutánea:

Las reacciones adversas asociadas a la inmunoterapia con vacunas alergénicas se pueden diferenciar en locales y sistémicas.

Reacciones locales: son las más frecuentes, particularmente en relación con los extractos y consiste en la aparición de edema, prurito y eritema en el lugar de la inyección.

Las reacciones sistémicas: son aquellas que se presentan a distancia del lugar de la inyección. Su presentación es más frecuente con reacción inmediata que puede llegar a un shock anafiláctico.

Inmunoterapia sublingual

Los principales inconvenientes de la inmunoterapia subcutánea se deben al riesgo de reacciones adversas graves, a las molestias locales originadas por la inyección y a la incomodidad que supone el tener que acudir periódicamente a un centro médico para recibir el tratamiento. Como solución a estos problemas se ha desarrollado la inmunoterapia sublingual. En esta modalidad el extracto se administra en forma de gotas, aunque pronto estarán disponibles en el mercado extractos sublinguales en comprimidos.

La absorción de fármacos a través de la mucosa bucal es rápida y efectiva, en algunos casos más rápida que cuando se efectúa de forma subcutánea.

El extracto se mantiene bajo la lengua 2 ó 3 minutos y posteriormente se traga. Esta forma de inmunoterapia es mucho más reciente que la subcutánea y aunque ya hay muchos estudios que avalan su eficacia, aún quedan varias incógnitas por aclarar. En cualquier caso es una forma muy segura que permite que el paciente realice su administración en el propio domicilio.

Ventajas de la Inmunoterapia Sublingual.

1. Cuando el alérgeno permanece en contacto con la mucosa durante unos dos minutos (tiempo recomendado durante la administración de la vacuna por vía sublingual), se produce su migración hacia los ganglios linfáticos regionales, lo que sugiere que las células dendríticas de la mucosa oral pueden captar el alérgeno y presentarlo en los ganglios a las células T.
2. El hecho de que la mucosa oral contenga escasos mastocitos, basófilos y eosinófilos, junto con el efecto barrera que supone la lámina propia para el paso de los alérgenos a la circulación general, permite explicar la buena tolerancia de esta forma de administración.
3. Accesibilidad del tratamiento sin necesidad de desplazamiento. Sería de utilidad, por lo tanto en personas con difícil acceso al especialista o en aquellos que dispongan de escaso tiempo para acudir a un servicio de salud.
4. Evita el uso de jeringas, es decir, evita la administración subcutánea que muchas veces resulta un impedimento para el inicio de la inmunoterapia.
5. Pocos efectos secundarios y si los hay son leves.

Efectos adversos de inmunoterapia sublingual.

Los estudios realizados con inmunoterapia sublingual coinciden en la gran seguridad de este tipo de terapia, habiéndose descrito efectos secundarios pero la gran mayoría de carácter leve. El efecto secundario más frecuentemente

descrito por el picor (prurito) a nivel sublingual y en la cavidad bucal así como el dolor abdominal. Otros efectos adversos descritos, aunque solo esporádicamente, han sido: cefalea, rinorrea, obstrucción nasal y urticaria.

La inmunoterapia sublingual es un tratamiento igualmente seguro tanto en adultos como en niños.

Época de Administración

En la actualidad hay tres posibles modalidades: perenne, pre estacional y coestacional.

Inmunoterapia perenne

Una vez alcanzada la dosis de mantenimiento ésta se repite mes a mes de forma continua durante todos los años que dure la vacuna. Es la forma de administración con la que se obtienen mejores resultados. Su principal inconveniente es que exige una cuidadosa valoración del paciente antes de cada dosis durante la época de síntomas y con frecuencia hay que reducir la dosis durante esas semanas.

Inmunoterapia pre estacional

Se utiliza en la alergia a pólenes, la dosis de mantenimiento se alcanza antes de la polinización y se mantiene sólo hasta que ésta empieza. Su eficacia es inferior a la inmunoterapia perenne porque la dosis acumulada es mucho

menor. Además obliga a repetir todos los años la fase de iniciación que es la más pesada y en la que aparecen más reacciones adversas.

Inmunoterapia coestacional

La vacuna se administra exclusivamente durante la época de exposición. Su uso es excepcional.

3.10 LIQUIDOS ORALES (2).

Son formas farmacéuticas líquidas que se administran por vía oral y son más fáciles de absorber que los medicamentos sólidos.

Las soluciones orales son soluciones acuosas de uno o más fármacos con o sin saborizantes, aromatizantes o agentes colorantes. Pueden ser formuladas para administración oral directa al paciente o ser proporcionadas en una forma más concentrada que debe ser diluida antes de su administración oral. También pueden proporcionarse como sólidos solubles o mezcla de sólidos solubles, para ser disueltos en agua u otros líquidos, antes de su administración oral.

En la formulación debe incluirse agentes antimicrobianos para proteger a la preparación de contaminación por bacterias, hongos y levaduras.

Las sustancias adicionadas a las formas farmacéuticas líquidas, deben ser inocuas en las cantidades administradas, no pueden causar toxicidad, ni entorpecer las pruebas y ensayos prescritos.

3.11 SOLUCIONES (6).

Puede definirse como formas farmacéuticas líquidas constituidas con uno o más fármacos activos disueltos en un vehículo adecuado, formando mezclas de dos o más sustancias químicas y físicamente homogéneas; es decir en una sola fase, constituida por uno o varios componentes en dispersión molecular. El que está en mayor proporción es disolvente y el de menor proporción es soluto.

Idealmente es un líquido límpido, incoloro o coloreado, de sabor y olor agradable o bien como mezclas de polvos para disolver extemporáneamente mediante el agregado de un volumen indicado de agua o de un vehículo que se acompaña.

3.12 CLASIFICACION DE LAS SOLUCIONES (7).

- Tamaño de partículas: Soluciones verdaderas, coloidales y suspensiones.
- Por la concentración: Empíricas y valoradas.
- Por la vía de administración: Oral, sublingual, parenteral, rectal y vaginal.
- Por el tipo de solución:

Soluciones acuosas:

- Soluciones simples: Soluciones, aguas, baños, pediluvios, lociones y aerosoles.

- Soluciones enterales: Pociones, tisanas (por solución, infusión y maceración), decocciones, sacarolados (jarabes, mielitos, sorbitolados), limonadas, zumos, enemas, lavajes.
- Soluciones parenterales: inyectables, soluciones salinas “sueros”.
- Soluciones oculares: colirios y baños.
- Soluciones errinas: gotas nasales.
- Soluciones bucales: gargarismos y colutorios.

Soluciones alcohólicas:

- Alcoholados: Soluciones alcohólicas (esencias), soluciones extractivas (tinturas y alcoholaturos).
- Alcoholados edulcorados: elixires.
- Soluciones poliólicas: glicerados (gotas, colutorios, etc.), otros polioldados (propilenglicol, polietilenglicol, etc.)
- Soluciones misceláneas: a solvente hidromiscible, a solvente homopolar (aceites).

3.13 FACTORES QUE DEBEN TOMARSE EN CUENTA EN LA PREPARACION DE SOLUCIONES. (8)

SOLUBILIDAD: Debido a que hay productos que podrían presentar problemas de insolubilidad del principio activo.

CALOR O TEMPERATURA: Si una sustancia absorbe calor aumenta su solubilidad.

TAMAÑO DE PARTICULA: Las partículas de un sólido finamente dividido solubilizan más rápidamente que los de mayor tamaño.

AGITACION: para la obtención de preparados homogéneos.

En la formulación de soluciones deben considerarse los siguientes componentes: (8)

1. Principio activo o base medicamentosa (el fármaco principal cuya acción terapéutica define el medicamento). Las propiedades físicas y organolépticas del mismo condicionarán la naturaleza del vehículo a emplear.
2. Coadyuvante es el fármaco adicionado al principio activo con la finalidad de ampliar su actividad terapéutica.
3. Vehículo debe tener la propiedad de solubilizar al principio activo y ser compatible con los otros componentes de la formulación.
4. Modificadores del pH.
5. Correctivos del sabor.
6. Correctivos del olor.
7. Correctivos del color.
8. Conservadores.
9. Secuestrante.
10. Antioxidantes.

3.14 VEHICULOS PARA PREPARACIONES LIQUIDAS ⁽⁶⁾.

El vehículo para una forma farmacéutica líquida puede ser un disolvente farmacéutico, una emulsión o una suspensión.

Las propiedades deseadas o requeridas del vehículo dependen de la vía de administración del medicamento a preparar y del tipo de sistema disolvente necesario.

VEHICULO.

Debe cumplir con ciertas características:

1. Inocuidad: Que no provoque ninguna reacción local
2. Inercia química: Que no reaccione con el activo
3. Características organolépticas agradables o aceptables.
4. Buenos solventes del fármaco (s).
5. Fisiológicamente compatibles.
6. sin acción farmacodinamia notoria.
7. Estables.
8. Atóxicos.

La principal característica es la de toxicidad, entendiendo por tal no sólo una actividad notoria, sino también la capacidad de irritar los tejidos, o provocar reacciones de sensibilización o alergia, a las dosis en que se han de utilizar.

La estabilidad requiere, aparte de no reaccionar química o físicamente con los otros ingredientes de una formulación, que no afecte por ácidos o álcalis, que no sea inflamable o tenga un punto de inflamación alto.

VEHICULOS ACUOSOS.

Deben cumplir la prueba de pirógenos < 151> o endotoxina bacteriana <85>, cualquiera que sea el especificado según la USP. Generalmente el agua para inyección es el vehículo usado, a menos que se indique otra cosa. Cloruro de sodio puede usarse en todo o en parte para sustituir el agua para inyección a menos que se indique otra cosa.

GILICERINA (8)

La glicerina es un solvente farmacéutico valioso que da lugar a la formación de soluciones permanentes y concentradas.

PROPILENGLICOL(8)

El propilenglicol como solvente se utiliza en numerosas formas orales – especialmente en gotas- de fármacos que son hidrolizables o bien que no son hidrosolubles.

SORBITOL:(8)

Se usa como sustituto del propilenglicol y de la glicerina. En preparados farmacéuticos orales “sin azúcar” como edulcorante se emplea hasta el 90%. Especificado en monografías de USP (Ver anexo N° 2).

CONSERVADORES. (6)

Sustancia que previene o inhibe el aumento microbiano y puede ser agregado a las preparaciones farmacéuticas con este fin para evitar la degradación subsiguiente previniendo el ataque de microorganismos, bacterias, hongos y levaduras.

Cuando NO es necesario añadir un conservador:

- Cuando el preparado se va a utilizar de inmediato.
- Cuando el preparado está ausente de agua.
- Si el pH del medio es <3 ó >9 .
- Si la preparación contiene sustancias antimicrobianas.

Cuando están contraindicados los conservadores:

- En pacientes recién nacidos.
- En soluciones oftálmicas.
- Productos parenterales con volúmenes mayores de 30 mL

Opciones cuando se requieren conservadores:

Prepárese con cautela limitada para utilizarse en un período corto, almacenar en refrigeración y fecha de caducidad corta.

Cualidades de un conservador Ideal:

- Eficaz en concentraciones mínimas.
- Naturaleza química estable.
- Soluble a la concentración requerida.
- Compatible con un gran número de principios activos.

- Libre de olor, sabor y color.
- No tóxico ni irritante,
- Costo razonable.
- No reactivo.

3.15 PRUEBAS FISICOQUIMICAS PARA DETERMINAR PROTEÍNAS⁽³⁾.

- Valoración de Biuret (Apartado <1047>)

Este método se basa en la interacción del ión cúprico Cu^{2+} con la proteína en una solución alcalina y el desarrollo de la absorbancia a 545 nm.

IV. DISEÑO METODOLOGICO

4.0. DISEÑO METODOLOGICO.

4.1 TIPO DE ESTUDIO.

- Transversal: Porque se estudia una problemática actual en el Hospital Nacional Rosales en el área de preparación de vacunas alergénicas, donde la demanda es tan grande que no permite el abastecimiento adecuado de éstas.
- Experimental: Se elaboraron preformulaciones para un preparado alergénico utilizado por vía sublingual, que fue preparado en el Área de Vacunas Alergénicas del Hospital Nacional Rosales y cuyos análisis se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA.

Se consultaron diferentes fuentes de información:

- Biblioteca “Dr. Benjamín Orozco”, Facultad de Química y Farmacia Universidad de El Salvador.
- Biblioteca “Dr. Luis Edmundo Vásquez”, Facultad de Medicina Universidad de El Salvador.
- Biblioteca de la Organización Mundial de la Salud ubicada en el edificio de la Rotonda frente al Hospital Nacional de Maternidad.
- Internet.

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO.

Universo: Comprende las vacunas alergénicas preparadas en el Hospital Nacional Rosales.

Muestra: Vacunas alergénicas preparadas a base de alérgeno de polvo y abeja, administradas por vía sublingual y cuyo vehículo es Glicerina, Sorbitol o Propilenglicol.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL.

Comprende tres partes:

1. Análisis de materias primas y envases.
2. Elaboración de preparados alergénicos.
3. Determinación de calidad y estabilidad de los preparados alergénicos:
Análisis Físico-químico y control Microbiológico.

Se utilizó un esquema de fabricación y análisis para materia prima y preparado alergénico. (Ver figura N° 2).

4.4.1 ANÁLISIS DEL ENVASE.

Se determinó la utilización de frascos de vidrio color ámbar con capacidad de 30 mL a los que no se realizó control microbiológico ya que se sometieron al proceso de autoclave a 121° C y 15 libras de presión durante 15 minutos.

Los goteros utilizados se obtuvieron del fabricante en su empaque individual sellado y estéril.

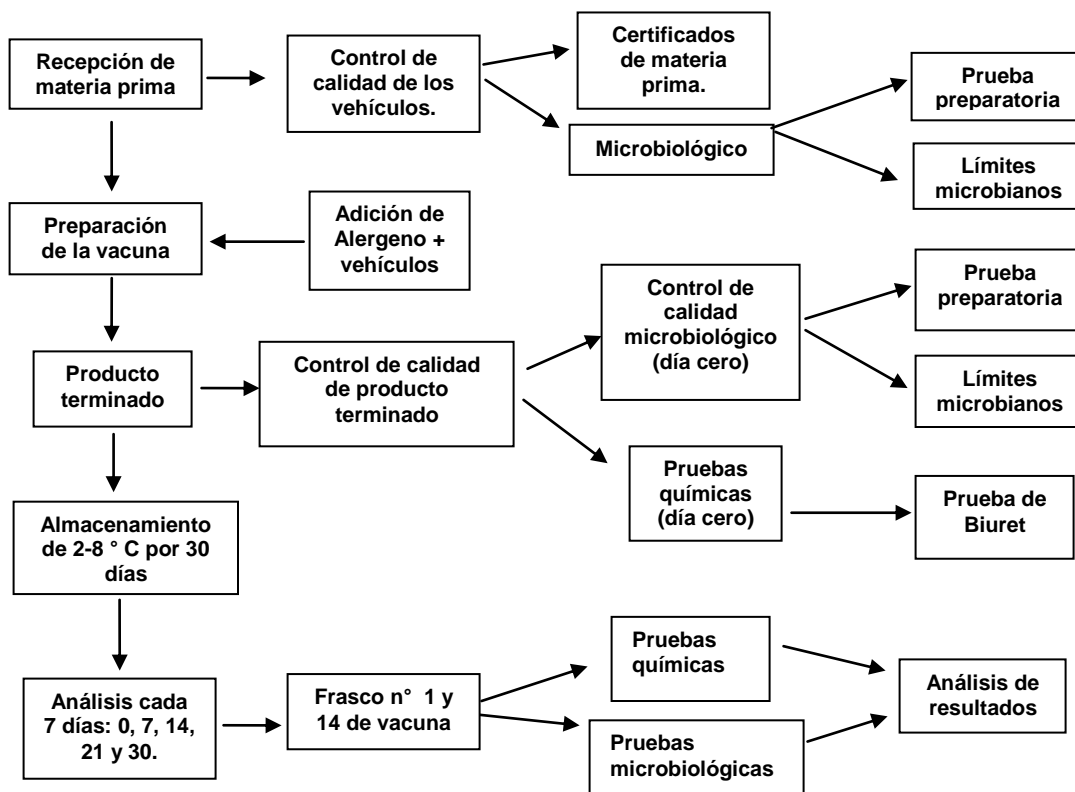


Figura N° 2: Esquema de fabricación y análisis de materia prima y preparados alérgicos.

4.4.2 ANALISIS DE MATERIA PRIMA

El proceso de fabricación y análisis se inició con la recepción de la materia prima. Cada materia prima se solicitó con su respectivo certificado de análisis, para garantizar su calidad.

Los certificados provistos (Anexo N° 1) indican que la materia prima cumple los requerimientos básicos para su utilización y consumo humano según sus monografías respectivas (Anexo N° 2).

Preparación de soluciones para los vehículos: Glicerina, Sorbitol y Propilenglicol al 50% v/v (Figura N° 3).



Figura N° 3: Preparación de vehículos al 50% v/v realizado dentro de la cabina de flujo laminar horizontal en el área de vacunas alergénicas del Hospital Nacional Rosales.

Preparar diluciones al 50% v/v de los vehículos: Glicerina, Sorbitol y Propilenglicol para un litro de solución, utilizadas para pre formular los preparados alergénicos en diluciones de polvo (1:5 y 1:500) y abeja (1:1000 y 1: 1,000,000).

- Limpiar y sanitizar del área de trabajo utilizando alcohol al 70% para desinfectar la cabina de flujo laminar horizontal.
- Medir 500 mL de cada uno de los vehículos: Glicerina, Propilenglicol y Sorbitol con probetas de 500 mL, y transferir a tres balones volumétricos de 1000 mL rotulados respectivamente. Hacer lavados de la probeta con pequeñas porciones de agua estéril, recoger los lavados en el balón volumétrico y aforar a 1.0 L con agua estéril.

4.4.2.1 EXAMEN MICROBIOLÓGICO DE LOS VEHÍCULOS DILUIDOS ⁽³⁾.

La prueba se desarrolló en tres etapas:

- Idoneidad del método.
- Recuento de microorganismos específicos.
- Prueba para microorganismos específicos.

4.4.2.1.1 IDONEIDAD DEL MÉTODO.

Esta prueba consistió en la inoculación de las muestras (vehículos) con los respectivos microorganismos de prueba. Si el microorganismo no crece en el medio utilizado queda invalidado el análisis.

Organismos de prueba.

Se emplearon cultivos de los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC N° 8739), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC N° 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC N° 6538) y *Salmonella typhimorium* (ATCC N° 14028).

Preparación de inóculos. (Anexo N° 3).

1. Inocular la superficie de una placa del medio especificado (tabla N° 1) para cada microorganismo por el método del estriado.
2. Incubar en las condiciones de cultivo respectivas (tabla N°1).

3. Luego del período de incubación lavar con un volumen aproximado de 5 mL de solución salina estéril. Los crecimientos bacterianos en cada placa (raspado suave), pipetear la solución sobrenadante y trasladar a un tubo con aproximadamente 5 mL de solución salina estéril (volumen total de la suspensión: 10.0 mL).

Tabla N° 1. Condiciones de cultivo para la preparación de Inóculos.

ORGANISMO	MEDIO APROPIADO	TEMPERATURA DE INCUBACION	INOCULO TIEMPO DE INCUBACION	RECUPERACION MICROBIANA TIEMPO DE INCUBACION
<i>Escherichia coli</i> (ATCCN° 8739)	Agar digerido de caseína y soya	32.5 ± 2.5°	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC N° 9027)	Agar digerido de caseína y soya	32.5 ± 2.5°	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC N° 6538)	Agar digerido de caseína y soya	32.5 ± 2.5°	18 a 24 horas	3 a 5 días
<i>Salmonella typhimorium</i> (ATCC 14028)	Agar digerido de caseína y soya.	32.5 ± 2.5°	18 a 24 horas	3 a 5 días

4. Realizar diluciones decimales sucesivas (1.0 mL de la suspensión anterior más 9.0 mL de solución salina estéril), hasta obtener una suspensión bacteriana stock de 1×10^8 UFC/mL. Verificar la concentración por recuento

en placas; tomar 1.0 mL de la dilución respectiva (por duplicado) y adicionar a dos placas de petri. Agregar 15 mL del medio respectivo para cada microorganismo de prueba. Luego incubar las placas a una temperatura de 32.5 ± 2.5 °C por un período de 24 horas. A cada una de las placas realizar conteo de colonias de microorganismos y obtener un promedio para cada par de placas de microorganismos.

5. Realizar cinco diluciones decimales sucesivas a partir de la dilución 1×10^8 UFC/mL, (1.0 mL de la dilución anterior más 9.0 mL de Solución salina estéril), para obtener una suspensión bacteriana de trabajo de concentración de: 1×10^3 UFC/mL.

Prueba de idoneidad del método con materia prima (vehículos).

1. Tomar 1.0 mL de la suspensión bacteriana de trabajo (1×10^3 UFC/mL) de cada uno de los microorganismos de prueba especificados en la tabla N° 1 e inocular por separado en 10 mL de cada una de las muestras: Glicerina, sorbitol y propilenglicol al 50% v/v respectivamente (Anexo N° 3).
2. Tomar los 10 mL de muestra contaminada de cada uno de los vehículos y adicionar a un tubo de ensayo de capacidad para 100mL con tapón de rosca que contiene 90 mL de caldo de caseína y soya (caldo CASOY).
3. Simultáneamente tomar 1.0 mL de muestra contaminada y transferir a dos placas de petri y agregar 15 mL de agar Trypticasa y soya.

4. Homogenizar las placas realizando movimientos en forma de 8, sobre la superficie de trabajo. Dejar solidificar el medio.
5. Incubar tubos y placas a 32.5 ± 2.5 ° C durante 24 horas.
6. Verificar el crecimiento y turbidez en tubos y placas; realizar conteos.

Nota: Si los vehículos y el producto terminado no inhiben el crecimiento de los microorganismos de prueba, se sigue con el procedimiento.

4.4.2.1.2 LÍMITES MICROBIANOS PARA MATERIA PRIMA (ANEXO N° 3).

Recuento de microorganismos específicos.

1. Tomar 10 mL de cada uno de los vehículos de prueba y transferir a un frasco de dilución que contiene 90 mL de solución amortiguadora de Fosfato de pH 7.2 respectivamente, etiquetada como dilución 10^{-1} .
2. De la dilución 10^{-1} tomar 10 mL y transferir a un frasco de dilución con 90 mL de solución amortiguadora de Fosfato de pH 7.0 etiquetar como dilución 10^{-2} .
3. De ambas diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) tomar 1.0 mL por duplicado y transferir a placas de petri estériles y adicionar 15.0 mL de TSA. Homogenizar las placas y dejar solidificar el medio. Luego incubar a 32.5 ± 2.5 ° C por 48 horas. Hacer recuento de las colonias presentes en las placas. Este es el recuento total de bacterias aerobias

4. De ambas diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) tomar 1.0 mL, por duplicado y transferir a placas de petri estériles. Adicionar 15 mL de agar papa-dextrosa (PD). Homogenizar las placas y dejar solidificar el medio. Luego incubar a temperatura ambiente por 5 días. Hacer recuento de las colonias presentes en las placas. Este es el recuento total de mohos y levaduras

Resultado Teórico:

El recuento aeróbico total utilizando el Método de placa no es mayor de 1000 UFC por g y el recuento total de hongos y levaduras no es mayor de 100 UFC por mL⁽³⁾.

4.4.2.1.3 PRUEBA PARA MICROORGANISMOS ESPECÍFICOS PARA MATERIA PRIMA.

Prueba para determinar ausencia de *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. (Anexo N° 3).

1. Tomar 10.0 mL de muestra de los diferentes vehículos y adicionar en un tubo de ensayo que contiene 90.0 mL de CASOY e incubar a 32.5 ± 2.5 °C por 24 horas. Si hay turbidez de los tubos se verifica la presencia o ausencia de *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
2. A partir del tubo con turbidez estriar una placa con agar Cetrimida. Incubar a 32.5 ± 2.5 °C por 24 horas y observar el crecimiento.
3. Estriar una placa con agar Baird Parker incubar a 32.5 ± 2.5 °C por 24 horas y observar crecimiento.

Resultado teórico:

Si no hay crecimiento de colonias con características de las tablas 2 y 3, la muestra de prueba cumple con los requisitos de ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

Tabla N° 2: Características morfológicas de *Staphylococcus aureus* en medio agar selectivo⁽³⁾.

Medio selectivo	Morfología característica de las colonias de <i>Staphylococcus aureus</i>	Tinción de gram
Medio Agar Baird-Parker	Negro, brillante, rodeado de zonas transparentes de 2mm a 5mm	Cocos positivos (en grupos)

Tabla N° 3: Características morfológicas de *Pseudomona aeruginosa* en medio agar selectivo y de diagnóstico⁽³⁾.

Medio Selectivo	Morfología característica de las colonias de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Fluorescencia en Luz UV	Prueba de Oxidasa	Tinción de Gram
Medio Agar Cetrimida	Generalmente Verdoso	Verdoso	Positivo	Bacilos Negativos

Prueba para determinar ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*
(Anexo N° 3).

1. Tomar 10.0 mL de muestra de los diferentes vehículos y adicionar en un tubo de ensayo que contiene 90.0 mL de caldo Lactosado e incubar a 32.5 ± 2.5 °C por 24 horas. Si hay turbidez se verifica la presencia o ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*
2. A partir del tubo con turbidez, tomar 1.0 mL de caldo y adicionar a un tubo que contenga 10 mL de tetrionato. Incubar a 32.5 ± 2.5 °C. Luego estriar en una placa con agar XLD. Incubar a 32.5 ± 2.5 °C por 24 horas y observar el crecimiento.
3. A partir del tubo de caldo Lactosado estriar en una placa con Agar MacConkey. Incubar a 32.5 ± 2.5 °C por 24 horas y observar el crecimiento.

Resultado teórico:

Al examinar las placas no presenta colonias como se indica en las tablas 4 y 5 la muestra cumple con los requisitos de la prueba para determinar la ausencia del género *Salmonella spp* y *Escherichia coli*.

Tabla N° 4. Características Morfológicas de *Salmonella spp* en medio agar selectivo(3).

Medio Selectivo	Morfología característica de las colonias de <i>Salmonella spp</i>
Medio agar Xilosa Lisina desoxicolato	De color rojo, con o sin centros negros

Tabla N° 5. Características Morfológicas de *Escherichia coli* en medio agar MacConkey (3).

Tinción Gram	Morfología característica de las colonias de <i>Escherichia coli</i>
Bacilos negativos (coco-bacilos)	De color rojo ladrillo, pueden tener una zona de bilis precipitada alrededor

4.4.3 PREPARACIÓN DEL PREPARADO ALERGÉNICO

Después de los análisis de la materia prima se realizaron diluciones de los alérgenos partiendo de los frascos rotulados del fabricante como: polvo 1:5 y abeja 1:10 hasta llegar a las diluciones de polvo 1:500 y abeja 1:1,000,000 que son las respectivas diluciones a utilizar en la fabricación de los preparados alérgenicos con cada uno de los diferentes vehículos (glicerina, sorbitol y propilenglicol) al 50% v/v.

4.4.3.1 Preparación de diluciones de los alérgenos: polvo y abeja en el Area Especializada de Vacunas Alergénicas.

Dilución 1:10 y 1:5

Los frascos obtenidos del fabricante tienen una concentración de 1:10 para abeja y 1:5 para polvo (Ver figura N° 4).



Figura N° 4: Frascos de alérgeno de polvo 1:5 y Abeja 1.10.

Dilución 1:100 para abeja (Figura N° 5)

- Rotular tres frascos viales de 10 mL con nombres de los vehículos a utilizar: Abeja en Glicerina 1:100, Abeja en Sorbitol 1:100 Y Abeja en Propilenglicol 1:100.
- Utilizar una jeringa de 1mL como micro pipeta volumétrica porque no se cuenta con el equipo adecuado para su medición y se corre el riesgo de perder mucho alérgeno ya que éstos son muy viscosos; la jeringa de 1 mL ya viene estandarizada del fabricante y se utiliza como medida de volumen exacto.
- Transferir 1 mL de alérgeno de abeja 1:10 a los tres frascos rotulados como abeja 1:100 para cada vehículo.
- Utilizar una jeringa de 10 mL como micro pipeta, adicionar 9 mL de los respectivos vehículos a los tres frascos viales.

Dilución 1:1000 para abeja (Figura N° 5).

- Rotular tres frascos viales de 10 mL con nombres de los vehículos a utilizar: Abeja en Glicerina 1:1000, Abeja en Sorbitol 1:1000 Y Abeja en Propilenglicol 1:1000
- Utilizar una jeringa de 1mL como micro pipeta volumétrica y transferir 1.0 mL de alérgeno de abeja 1:100 a los tres frascos rotulados como abeja 1:1000.
- Utilizar una jeringa de 10 mL como micro pipeta, adicionar 9.0 mL de los respectivos vehículos a los seis frascos viales.

Dilución 1:10,000 para abeja. (Figura N° 5).

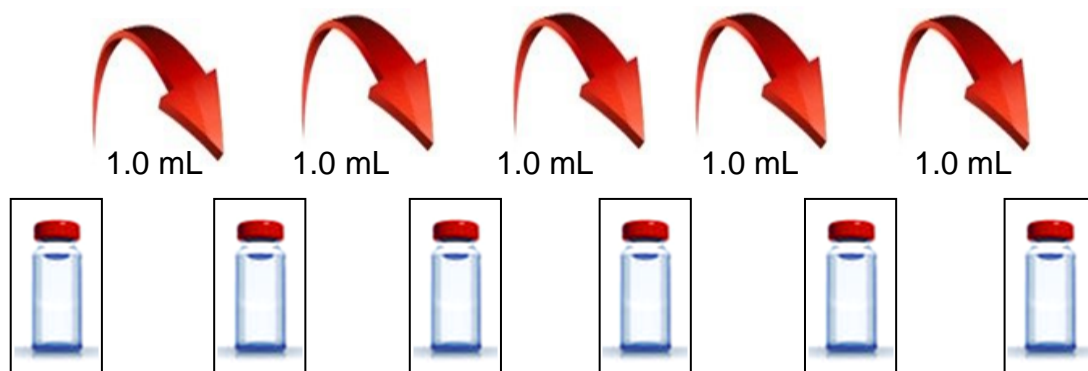
- Rotular tres frascos viales de 10 mL con el nombre del vehículo: Abeja en glicerina 1:10,000, Abeja en propilenglicol 1:10,000, Abeja en sorbitol 1:10,000.
- Con una jeringa de 1mL transferir 1.0 mL de alérgeno de abeja en dilución 1:1000 a cada uno de los tres frascos viales.
- Complementar con 9.0 mL de los respectivos vehículos.

Dilución 1:100,000 para abeja (Figura N° 5).

- Rotular tres frascos viales de 10 mL con el nombre del vehículo: Abeja en glicerina 1:100,000, Abeja en propilenglicol 1:100,000, Abeja en sorbitol 1:100,000.
- Usar una jeringa de 1mL y transferir 1.0 mL de alérgeno de abeja en dilución 1:10,000 a cada uno de los tres frascos viales.
- Complementar con 9.0 mL de los respectivos vehículos.

Dilución 1:1, 000,000 para abeja (Figura N° 5).

- Rotular tres frascos viales de 10 mL con el nombre del vehículo: Abeja en glicerina 1:1,000,000, Abeja en propilenglicol 1:1,000,000, Abeja en sorbitol 1:1,000,000.
- Usar una jeringa de 1.0 mL y transferir 1.0 mL de alérgeno de abeja en dilución 1:100,000 a cada uno de los tres frascos viales.
- Complementar con 9.0 mL de los respectivos vehículos.



Presentación

Frasco 1:10	9.0 mL de vehículo	9.0 mL de vehículo	9.0 mL de vehículo	9.0 mL de vehículo	9.0 mL de vehículo
Equivalente	1:100	1:1000	1:10,000	1:100,000	1:1,000,000
a: 1.0g/10mL	10 mg/mL	1.0 mg/mL	0.1 mg/mL	0.01 mg/mL	0.001 mg/mL
100 mg/mL					

Figura N° 5: Diluciones para alérgeno de abeja en los vehículos glicerina, sorbitol y propilenglicol.

Dilución 1:50 polvo (Figura N° 6)

- Rotular tres frascos viales de 10 mL con nombres de los vehículos a utilizar:
Polvo en glicerina 1:50, Polvo en sorbitol 1:50, Polvo en propilenglicol 1:50.
- Usar una jeringa de 1.0 mL y transferir 1.0 mL de alérgeno de polvo en dilución 1:5 a tres frascos viales de 10 mL rotulados como polvo 1:50.
- Usar una jeringa de 10 mL utilizada como micro pipeta y adicionar 9.0 mL de los respectivos vehículos a los tres frascos viales.

Dilución 1:500 para polvo (Figura N° 6)

- Rotular tres frascos viales de 10 mL con nombres de los vehículos a utilizar: Polvo en glicerina 1:500, Polvo en sorbitol 1:500, Polvo en propilenglicol 1:500.
- Usar una jeringa de 1mL y transferir 1.0 mL de alérgeno de polvo en dilución 1:50 a tres frascos viales de 10 mL rotulados como polvo 1:500 respectivamente.

4.4.3.2 Preparación de la vacuna alérgénica.

La terapia alérgénica consta de 14 frascos preparados a partir de las diluciones de los alérgenos mencionados en el numeral 4.4.3.1. El esquema de fabricación de los 14 frascos se presenta en los anexos N° 4 y N° 5.

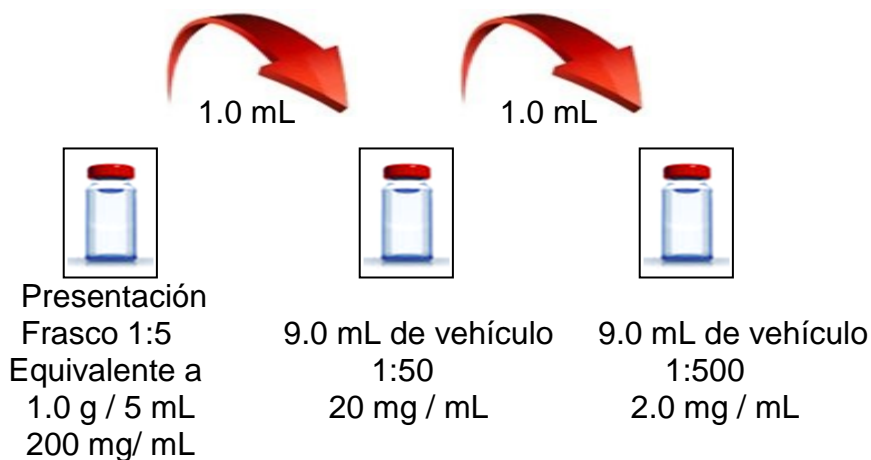


Figura N° 6: Diluciones para alérgeno de polvo en los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol.

Para efectos de investigación preparar los frascos N° 1 y N° 14 de cada alérgeno en cada uno de los vehículos. Adicionar en un frasco gotero de vidrio color ámbar con capacidad de 30 mL las cantidades de volumen respectivo determinadas previamente en las concentraciones establecidas para cada número de frasco de alérgeno (según cuadros N° 1 y N° 2) complementar los preparados con una cantidad de vehículo suficiente hasta llevar a volumen de 10.0 mL.(Utilizar en el análisis los frascos N° 1 y N° 14 de cada uno de los alérgenos).

Preparación del preparado alérgico por vía sublingual para frasco N° 1 y N° 14 (Anexo N° 7).

- Usar una jeringa de 1 mL y tomar el volumen señalado en el cuadro N° 1 y N° 2, de la dilución respectiva (preparada en el numeral 3.1).
- Transferir el volumen de alérgenos a frascos goteros de 30 mL rotulados como: glicerina, sorbitol o propilenglicol.
- Adicionar la cantidad de vehículo indicada en el cuadro N° 1 y N° 2.

Por ejemplo para el frasco N° 1 tenemos:

$$\text{Total de vehículo a adicionar} = 10\text{mL} - \Sigma \text{alérgenos}$$

$$\text{Total de vehículo a adicionar} = 10\text{mL} - 0.05 \text{ mL}$$

$$\text{Total de vehículo a adicionar} = 9.95 \text{ mL.}$$

- Homogenizar y tapar con gotero de rosca (Figura N° 7).

Dónde: Σ = Sumatoria



Figura N° 7: Frascos de preparados alergénicos (producto terminado).

Cuadro N° 1: Preparación de vacuna alergénica para alérgeno de abeja 1:10

N° de Frasco del alérgeno	Tomar alícuotas del alérgeno en dilución 1:1,000,000.	Volumen de vehículo.
Frasco N° 1 ([]: 5×10^{-6} mg/ mL)	0.05 mL de c/ alérgeno	9.95 mL
	Tomar alícuotas del alérgeno en dilución 1:10.	
Frasco N° 14 ([]: 2×10^{-1} mg/ mL)	0.20 mL de c/ alérgeno	9.80 mL
Llevar a volumen de 10 mL con soluciones al 50% v/v de cada vehículo: glicerina, sorbitol o propilenglicol		

Cuadro N° 2: Preparación de vacuna alergénica para alérgeno de polvo 1:5

N° de Frasco del alérgeno	Tomar alícuotas del alérgeno en dilución 1:500	Volumen de vehículo.
Frasco N° 1 ([]: 1×10^{-2} mg/ mL)	0.05 mL de c/ alérgeno	9.95 mL
	Tomar alícuotas del alérgeno en dilución 1:5.	
Frasco N° 14 ([]: 4.0 mg/ mL)	0.20 mL de c/ alérgeno	9.80 mL
Llevar a volumen de 10 mL con soluciones al 50% v/v de cada vehículo: glicerina, sorbitol o propilenglicol		

4.4.4 ANALISIS DE PRODUCTO TERMINADO

Realizar control de calidad microbiológico: idoneidad del método, límites microbianos y control de calidad físico- químico: prueba de Biuret.

Los análisis se hicieron en un período de un mes e intervalos de tiempo cada 7 días tomando el día de preparación como día cero.

4.4.4.1. CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO:

4.4.4.1.1 IDONEIDAD DEL MÉTODO Y LÍMITES MICROBIANOS PARA PRODUCTOTERMINADO.

Nota: El procedimiento de análisis para prueba preparatoria y límites microbianos se realizó de forma similar a los análisis para materia prima

desarrollados desde la página n° 56 hasta la página n° 63, utilizando 10 mL de cada preparado alergénico para cada determinación (Ver anexo N° 3).

4.4.4.1.2 PRUEBAS DE ESTABILIDAD PARA PREFORMULACIONES DE PREPARADOS ALERGÉNICOS.

4.4.4.1.2.1 PRUEBAS CARACTERÍSTICAS DE IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: VALORACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES (VALORACIÓN DE BIURET).

Este método se basa en la interacción del ión cúprico Cu^{2+} con la proteína (albúmina de bobino) en una solución alcalina y el desarrollo de la absorbancia a 545 nm.

Preparación de reactivos. (Ver anexo N° 6).

Paso 1: Preparación de la solución madre de albúmina.

- Pesar 20 mg de albúmina y disolver en 10 mL de solución de Cloruro de Sodio (NaCl) 9: 1000.

Paso 2: Preparación de la solución estándar.

- Preparar una solución de albúmina de bobino para obtener 5 soluciones estándar de albúmina entre 0.5mg y 10mg por mL para tener una curva patrón de comparación para las muestras (Ver figura N° 8).
- De la solución madre tomar 2.5 mL y llevar a un balón volumétrico de 5.0 mL; aforar con NaCl 9:1000 para obtener una concentración de 10 mg/mL
- De la solución madre tomar 1.875 ml y llevar a volumen de 5.0 ml para obtener una concentración de 7.5 mg/mL

- De la solución madre tomar 1.25 mL y llevar a volumen de 5.0 mL para obtener una concentración de 5.0 mg/mL
- De la solución madre tomar 0.625 mL y llevar a volumen de 5.0 mL para obtener una concentración de 2.5 mg/mL
- De la solución madre tomar 0.125 mL y llevar a volumen de 5.0 mL para obtener un concentración de 0.5 mg/mL

Paso 3: Solución de prueba.

Preparar soluciones de alérgenos de prueba (abeja frasco N° 1 y N° 14 con concentraciones de 5×10^{-5} mg/mL y 2×10^{-1} mg/mL respectivamente y alérgeno de polvo frasco N° 1 y N° 14 con concentraciones de 1×10^{-2} y 4.0 mg/mL respectivamente) en solución de Cloruro de Sodio (NaCl) 9:1000 que deben estar comprendidas entre el intervalo de 0.5 y 10 mg/mL de la solución estándar.

Procedimiento.

- Medir 2.5 mL de cada una de las soluciones de prueba y solución de Hidróxido de sodio (NaOH) 6:100 y mezclar en un vaso de precipitados de 10 mL
- agregar 1.0 mL de reactivo de Biuret y mezclar.
- Dejar en reposo a temperatura ambiente entre 15 y 25° C, durante no menos de 15 minutos.
- Dentro de los 90 minutos siguientes a la adición del reactivo de Biuret, determinar las absorbancias de las soluciones estándar y de la solución

obtenida de la solución de prueba a la longitud de onda de absorbancia máxima a 545 nm.

Blanco.

Usar la solución de Cloruro de sodio (NaCl) 9:1000 para ajustar a cero el equipo.

Cálculos:

Usar el método de regresión lineal de cuadrados mínimos y graficar las absorbancias de las soluciones estándar (figura N° 8) en función de las concentraciones de proteínas, determinar la curva estándar que mejor se ajuste a los puntos graficados y calcular el coeficiente de correlación para la línea. Un sistema adecuado es aquel que produce una línea con un coeficiente de correlación de no menos de 0.99.



Figura N° 8: Soluciones estándar de Albúmina de bobino para realizar curva patrón.

V. RESULTADOS E INTERPRETACION DE RESULTADOS.

5.0 RESULTADOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Preparación de Vehículos.

Preparar soluciones al 50% de cada uno de los vehículos y presentaron las propiedades físicas descritas en la tabla N° 6.

Tabla N° 6: Propiedades físicas de los vehículos al 50%.

Muestra	Apariencia	Consistencia	Olor	Color	Solubilidad
Glicerina	Líquida	Viscosa y poco fluida	dulce	transparente	Totalmente soluble en agua
Propilenglicol	Líquida	Viscosa y poco fluida	dulce	transparente	Totalmente soluble en agua
Sorbitol	Líquida	Viscosa y poco fluida	dulce	transparente	Totalmente soluble en agua

ANALISIS MICROBIOLÓGICO.

Idoneidad del método para materia prima.

Se realizó un análisis previo a la materia prima que consistió en la prueba preparatoria la que demostró que las muestras no inhiben por sí solas la multiplicación de los microorganismos patógenos que pudieran estar presentes bajo las condiciones de prueba especificadas en la USP.

Tabla N° 7: Resultados de análisis de prueba preparatoria para los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol en soluciones al 50% v/v.

MUESTRA	MICROORGANISMOS PATOGENOS					
	CASOY	MEDIO SELECTIVO	RTB			
			<i>E. coli</i>	<i>Salmonella typhimorium</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Estafilococos aureus</i>
			10^{-1} Y 10^{-2}	10^{-1} Y 10^{-2}	10^{-1} Y 10^{-2}	10^{-1} Y 10^{-2}
G ₁	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
G ₂	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
S ₁	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
S ₂	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
P ₁	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
P ₂	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC

Donde:

- DNPC: Demasiado numeroso para contarlos.
- G: es el vehículo glicerina en solución al 50 % v/v.
- S: es el vehículo Sorbitol en solución al 50% v/v.
- P: es el vehículo propilenglicol en solución al 50 % v/v.

- 1 y 2: El ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada una de las muestras.
- 10^{-1} Y 10^{-2} : Diluciones de los microorganismos patógenos.
- RTB: Recuento total de bacterias.

Recuento Total de microorganismos patógenos. (Ver anexo N° 3).

En el ensayo realizado a los vehículos todos presentaron turbidez en los respectivos medios de cultivo y crecimiento en las placas demasiado numeroso para contar de los diferentes microorganismos de prueba especificados; por lo que los vehículos no inhiben por sí solos el crecimiento de microorganismos específicos y por lo tanto son susceptibles al ataque de éstos. Este resultado permitió continuar el proceso de control de calidad de los productos. (Ver figuras N° 9, 10, 11 y 12)

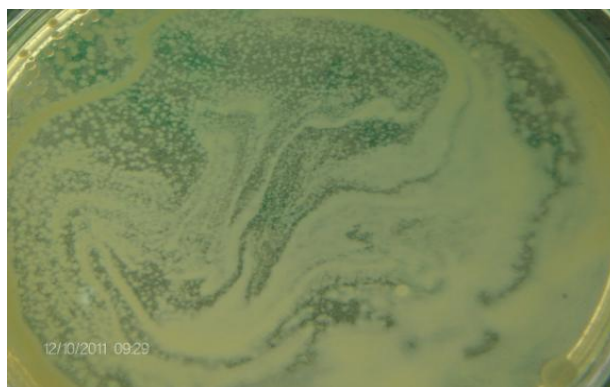


Figura N° 9: Placa con crecimiento de *Escherichia coli*

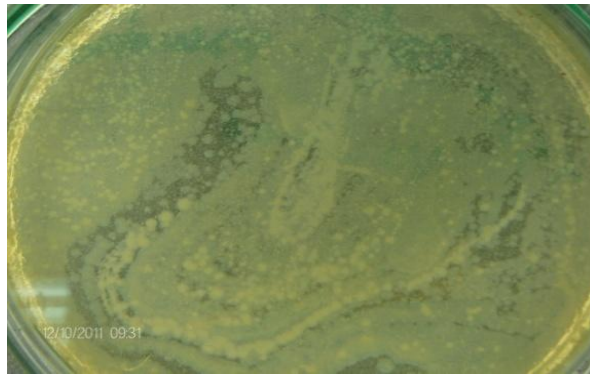


Figura N°10: Placa con crecimiento de *Staphylococcus aureus*



Figura N° 11: Placa con crecimiento *Salmonella typhimorium*

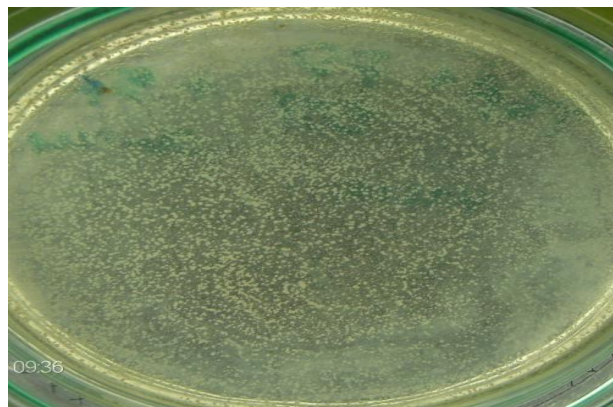


Figura N° 12: Placa con crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

Límites microbianos para materia prima.

Los límites microbianos para los vehículos al 50% v/v se utilizaron para estimar el número de microorganismos viables presentes y para determinar la ausencia de especies microbianas que pudieran existir en éstos. Obteniendo como resultado ausencia de crecimiento de los microorganismos de prueba.

Idoneidad del método para preparado alergénico

Después del análisis de la materia prima se realizó la prueba preparatoria al producto alergénico. (Ver resultados en tabla N° 9)

Tabla N° 8: Resultados de análisis de materia prima.

Muestra Vehículo al 50%	Límites microbianos				Resultado	Microorganismos específicos			
	RTB		RH y L			CASOY	Medio selectivo	<i>E.coli</i> y <i>Salmonella</i> spp	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> y <i>St. aureus</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²					
G	0	0	0	0	< 10 UFC/mL	Sin crecimiento	Sin crecimiento	negativo	negativo
P	0	0	0	0	< 10 UFC/mL	Sin crecimiento	Sin crecimiento	negativo	negativo
S	0	0	0	0	< 10 UFC/mL	Sin crecimiento	Sin crecimiento	negativo	Negativo

Dónde:

- Medio selectivo: Se usaron los medios especificados en las tablas N° 2, 3, 4 y 5 descritas en el diseño metodológico.
- 0: Sin crecimiento en las placas

- Negativo: ausencia de crecimiento de los microorganismos de prueba.
- 10^{-1} Y 10^{-2} : Diluciones de los microorganismos patógenos.
- RTB: Recuento total de bacterias.
- RH y L: recuento de hongos y levaduras.
- < 10 UFC/mL: Menos de 10 unidades formadoras de colonias por mililitro.

Tabla N° 9:Idoneidad del método para producto terminado.

MUESTRA	MICROORGANISMOS PATOGENOS					
	CASOY	MEDIO SELECTIVO	RTB			
			<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
			10^{-1} Y 10^{-2}	10^{-1} Y 10^{-2}	10^{-1} Y 10^{-2}	10^{-1} Y 10^{-2}
AG1	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
AG14	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
AP1	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
AP14	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
AS1	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
AS14	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
PG1	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
PG14	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
PP1	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
PP14	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC

Tabla N° 9: Continuación

MUESTRA	MICROORGANISMOS PATOGENOS					
	CASOY	MEDIO SELECTIVO	RTB			
			<i>E. coli</i>	<i>Salmonella spp</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
			10 ⁻¹ Y 10 ⁻²	10 ⁻¹ Y 10 ⁻²	10 ⁻¹ Y 10 ⁻²	10 ⁻¹ Y 10 ⁻²
PS1	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC
PS14	+	+	DNPC	DNPC	DNPC	DNPC

Dónde:

- DNPC: Colonias demasiado numerosas para contarse.
- A: son los preparados alergénicos de abeja en los diferentes vehículos: Glicerina (AG), Propilenglicol (AP) y Sorbitol (AS) para frascos N° 1 y N° 14 respectivamente.
- P: son los preparados alergénicos de polvo en los diferentes vehículos: Glicerina (PG), Propilenglicol (PP) y Sorbitol (PS) para frascos N° 1 y N° 14 respectivamente.
- +: Hay turbidez en los tubos, se toma como prueba positiva.

Recuento total de microorganismos patógenos.

En el ensayo realizado a los preparados alérgicos (indicado en la tabla N° 9) las muestras presentaron turbidez en el medio selectivo y crecimiento en las placas con agar selectivo demasiado numeroso para contar de los diferentes microorganismos de prueba especificados. Este resultado indica que los preparados alérgicos son susceptibles al ataque de los microorganismos de prueba.

Nota: los análisis microbiológicos se realizaron en el tiempo de un mes, comprendidos en periodos de cada siete días (0, 7, 14, 21 y 30 días) tomando el día de preparación como día cero.

Los resultados obtenidos del recuento total de bacterias aerobias y recuento de hongos y levaduras no presentaron crecimiento en las placas inoculadas de los preparados alérgicos dando un resultado < 10 UFC / mL por lo que se considera conforme ya que no presenta crecimiento de dichas especies en el preparado alérgico analizado.

Tabla N° 10. Resultados de análisis microbiológicos del preparado alérgico. Día 0.

MUESTRA	LIMITES MICROBIANOS					MICROORGANISMOS PATOGENOS		
	RTB / RHyL					CASOY	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	RESULTADO			
AG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo

Nota: misma simbología que las tablas N° 8 y 9.

Los resultados obtenidos al analizar los microorganismos patógenos no presentaron crecimiento en el medio específico lo que indica que el resultado es conforme a lo indicado por la USP 30.

Tabla N° 11. Resultados de análisis del preparado alergénico. Día 7.

MUESTRA	LIMITES MICROBIANOS					MICROORGANISMOS PATOGENOS		
	RTB / RHyl					CASOY	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> <i>spp</i>	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	RESULTADO			
AG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo

Nota: misma simbología que las tablas N° 8 y 9.

Los resultados obtenidos del recuento total de bacterias aerobias y recuento de hongos y levaduras no presentaron crecimiento en las placas inoculadas de los preparados alérgicos dando un resultado < 10 ufc / mL esto indica que la prueba es conforme a lo indicado por la USP 30.

Los resultados obtenidos al analizar los microorganismos patógenos no presentaron crecimiento en el medio específico esto indica que el resultado es conforme a lo indicado en la USP 30.

Tabla N° 12. Resultados de análisis del preparado alérgico. Día 14.

MUESTRA	LIMITES MICROBIANOS					MICROORGANISMOS PATOGENOS		
	RTB / RHyL					CASOY	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-2}	RESULTADO			
AG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo

Tabla N° 12. (Continuación).

MUESTRA	LIMITES MICROBIANOS					MICROORGANISMOS PATOGENOS		
	RTB / RHyL					CASOY	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	RESULTADO			
PG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo

Nota: misma simbología que las tablas N° 8 y 9.

Los resultados obtenidos del recuento total de bacterias aerobias y recuento de hongos y levaduras sin crecimiento en las placas inoculadas de los preparados alergénicos dando un resultado < 10 ufc / mL lo que se considera conforme a lo establecido en la USP 30.

Los resultados obtenidos al analizar los microorganismos patógenos no presentaron crecimiento en el medio específico lo que indica que el resultado es conforme a lo establecido en la USP 30.

Tabla N° 13. Resultados de análisis del preparado alergénico. Día 21.

MUESTRA	LIMITES MICROBIANOS					MICROORGANISMOS PATOGENOS		
	RTB / RHyL					CASOY	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> <i>typhimorium</i>	<i>Pseudomonaaerug</i> <i>inosa</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	RESULTADO			
AG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo

Tabla N° 13. (Continuación)

MUESTRA	LIMITES MICROBIANOS					MICROORGANISMOS PATOGENOS		
	RTB / RHyL					CASOY	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	RESULTADO			
PP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo

Nota: misma simbología que las tablas N° 8 y 9.

Los resultados obtenidos del recuento total de bacterias aerobias y recuento de hongos y levaduras no presentaron crecimiento en las placas inoculadas de los preparados alergénicos dando un resultado < 10 ufc / mL lo que indica que es conforme a lo establecido en la USP 30.

Los resultados obtenidos al analizar los microorganismos patógenos no presentaron crecimiento en el medio específico por lo que el resultado es conforme a lo establecido en la USP 30.

Tabla N° 14: Resultados de análisis del preparado alergénico. Día 30

MUESTRA	LIMITES MICROBIANOS					MICROORGANISMOS PATOGENOS		
	RTB / RHyL					CASOY	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> spp	<i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	RESULTADO			
AG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
AS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PG14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PP14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS1	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo
PS14	0	0	0	0	< 10 UFC / mL	Sin crecimiento	Negativo	Negativo

Nota: misma simbología que las tablas N° 8 y 9.

Los resultados obtenidos del recuento total de bacterias aerobias y recuento de hongos y levaduras no presentaron crecimiento en las placas inoculadas de los

preparados alérgicos dando un resultado < 10 ufc / mL lo que indica que es conforme a lo establecido en la USP 30.

Los resultados obtenidos al analizar los microorganismos patógenos no presentaron crecimiento en el medio específico indica que el resultado es conforme a la USP 30.

El resultado final en este proceso de análisis para el período de un mes se completó obteniendo resultados conforme a lo establecido de la USP por lo tanto el preparado alérgico se conservó libre del ataque de microorganismos en las condiciones de almacenamiento durante el período de prueba.

ANALISIS FISICO QUIMICO.

Materia prima.

Se realizaron mediciones de las absorbancias de los vehículos para cuantificar las proteínas posiblemente presentes que pudieran compararse contra los alérgenos de abeja y polvo. (Ver tablas: N° 16 y N° 17).

Tabla N° 15: Absorbancias de las soluciones estándar leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm.

BSA (mg/ml)	Abs. Std	Ab.std- B
0,0000	0,181	0
0,3125	0,160	-0,021
0,6250	0,197	0,016
1,2500	0,214	0,033
2,5000	0,364	0,183
5,0000	0,385	0,204
10,0000	0,589	0,408

Dónde:

BSA: Concentraciones teóricas de curva patrón.

Abs. Std: Absorbancia de los estándares prácticos.

Abs. Std – B: Diferencia de las absorbancias entre los estándares prácticos y el blanco.

Tabla N° 16: Absorbancias de materias primas leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm.

MUESTRAS	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	B	Promedio	Vc
G	0.171	0.18	0.192	0.181	0.181	0
P	0.191	0.171	0.173		0.178	0.003
S	0.164	0.170	0.233		0.189	0.008

Dónde:

Muestras: Vehículos glicerina (G), sorbitol (S) y propilenglicol (P).

Lecturas 1, 2 y 3: Absorbancias de las muestras

B: Absorbancia del blanco.

Prom: Absorbancia promedio.

Vc: Absorbancias promedio – blanco.

Se tomaron las absorbancias de los vehículos para verificar la posible interferencia con las absorbancias de las proteínas (alérgenos).

Los resultados obtenidos de las lecturas de los vehículos son despreciables lo que demuestra que los mismos no tienen en su composición materiales que interfieran en la cuantificación de las proteínas.

Preparado alergénico.

Teniendo en cuenta las concentraciones teóricas para los diferentes alérgenos indicadas en la tabla N° 17; se trazó una curva estándar partiendo de una solución de albúmina de bovino (ver tabla N° 18 y figura N° 13), se realizaron mediciones de las absorbancias de los preparados alergénicos para cuantificar las proteínas de los alérgenos de abeja y polvo. (Ver tabla N° 19).

Tabla N° 17: Datos de concentraciones teóricas para alérgenos de abeja y polvo en los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol al 50%.

NUMERO DE FRASCO	CONCENTRACION TEORICA ALERGENO ABEJA	CONCENTRACION TEORICA ALERGENO POLVO
FRASCO # 1	5×10^{-6} mg/MI	1×10^{-2} mg/mL
FRASCO # 14	2×10^{-1} mg/MI	4.0 mg/MI

Tabla nº 18: Absorbancias de las soluciones estándar leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 545 nm.

BSA (mg/ml)	Mes. 1	Mes. 2	Mean value	mv-background
0.00000	0.136	0.142	0.139	0.000
0.31250	0.153		0.153	0.014
0.62500	0.169		0.169	0.030
1.25000	0.198		0.198	0.059
2.50000	0.264		0.264	0.125
5.00000	0.379		0.379	0.240
10.00000	0.616		0.616	0.477

Dónde:

BSA(mg/ml): Concentraciones de las soluciones estándar teóricas.

Mes. 1: Absorbancia de las soluciones estándar prácticas.

Mes. 2: Absorbancia del blanco.

Mean value: Absorbancia promedio.

mv- background: Absorbancia promedio – absorbancia del blanco.

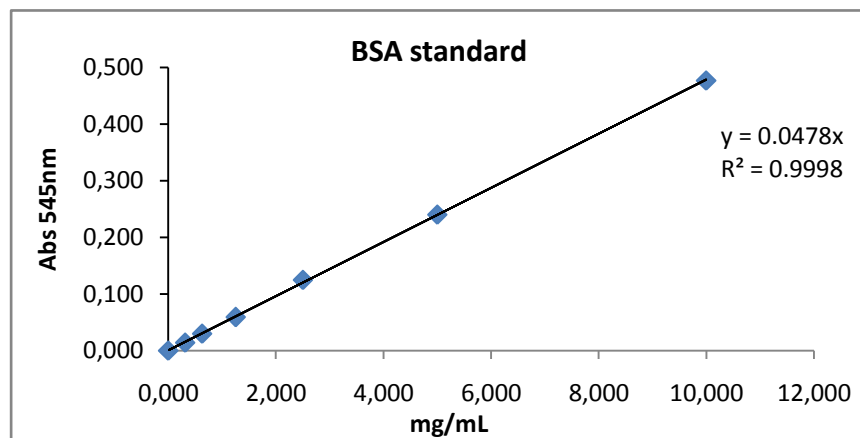


Figura N° 13: Grafica de las soluciones estándar de albumina a una longitud de onda de 545 nm

Tabla N° 19: Datos de concentraciones prácticas para alérgenos de abeja y polvo en los vehículos: glicerina, sorbitol y propilenglicol al 50%v/v para los días: 0, 7,14, 21 y 30.

MUESTRAS	0d	7d	14d	21d	30d
	conc(mg/mL)	conc(mg/mL)	conc(mg/mL)	conc(mg/mL)	conc(mg/mL)
AG1	0.221	0.573	0.648	0.314	0.366
AG14	0.442	0.637	0.541	0.481	0.429
AP1	0.398	0.488	0.732	0.816	0.764
AP14	0.310	0.892	0.329	0.607	0.805
AS1	0.310	0.510	0.520	0.502	0.722
AS14	0.376	0.616	0.626	0.460	0.450
PG1	0.088	0.361	0.541	0.669	0.450
PG14	0.265	0.446	0.478	0.816	0.554
PP1	0.376	0.807	0.754	0.669	0.847
PP14	0.310	0.616	0.732	0.649	0.659
PS1	0.133	0.573	0.732	0.628	0.282
PS14	0.111	0.446	0.435	1.172	0.513

Dónde:

- A: son los preparados alérgicos de abeja en los diferentes vehículos: Glicerina (AG), Propilenglicol (AP) y Sorbitol (AS) para frascos N° 1 y N° 14 respectivamente.
- P: son los preparados alérgicos de polvo en los diferentes vehículos: Glicerina (PG), Propilenglicol (PP) y Sorbitol (PS) para frascos N° 1 y N° 14 respectivamente.
- Conc (mg/mL): Concentración de las proteínas en los diferentes vehículos.
- (0, 7, 14, 21 y 30)d: Días respectivos en los que se realizan las mediciones.

El análisis realizado al preparado alérgico se hizo en un mes por períodos de cada siete días lo que indicó que en éste se evidencia la existencia de contenido proteico mediante la medición de las concentraciones de cada una de sus diferentes diluciones: frascos N° 1 y N° 14; a su vez también se reporta que las concentraciones calculadas tienen al inicio del análisis tendencia a aumentar en los períodos de tiempo en la primera, segunda y tercera semanas disminuyendo en las dos semanas restantes (ver Tabla N° 18 y figuras N° 14, 15, 16, 17,18 y 19); estos valores no se acercan a los valores calculados teóricamente por lo que no puede hacerse un análisis comparativo entre datos teóricos y experimentales.

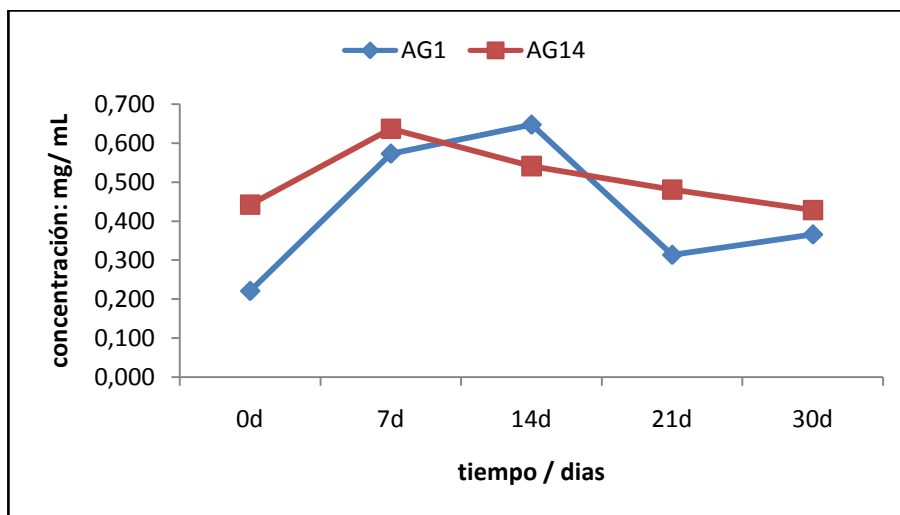


Figura N° 14: Gráficas de preparados alérgicos de abeja en glicerina frascos N° 1 y N° 14 (AG1 y AG14).

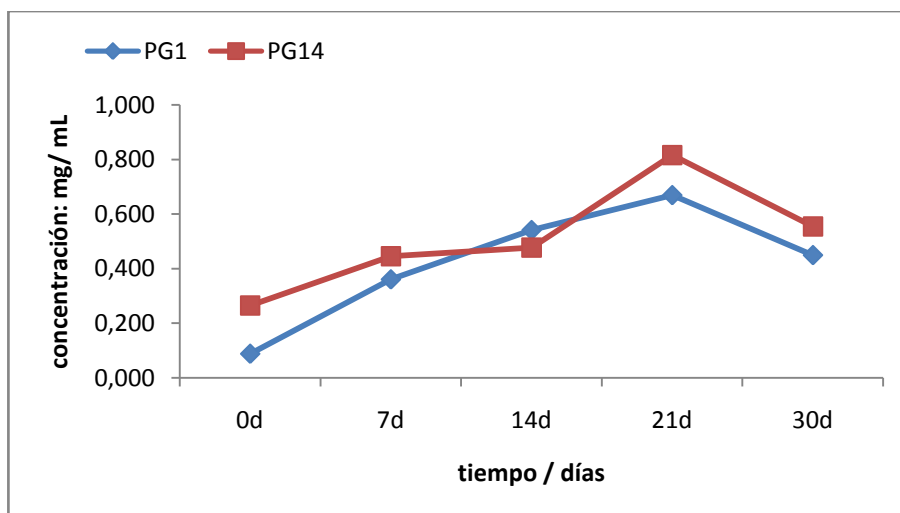


Figura N° 15: Gráficas de preparados alérgicos de polvo en glicerina frascos N° 1 y N° 14 (PG1 y PG14).

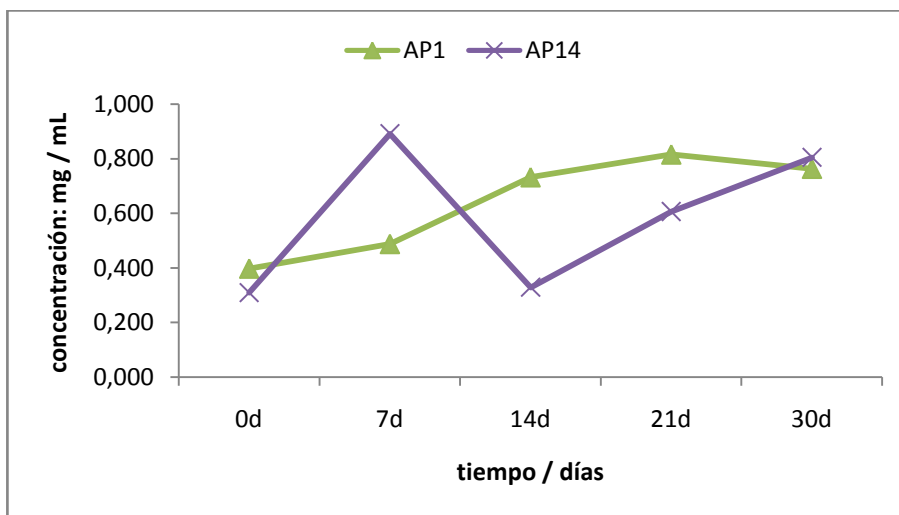


Figura N° 16: Gráficas de preparados alergénicos de abeja en propilenglicol frascos N° 1 y N° 14 (AP1 y AP14).

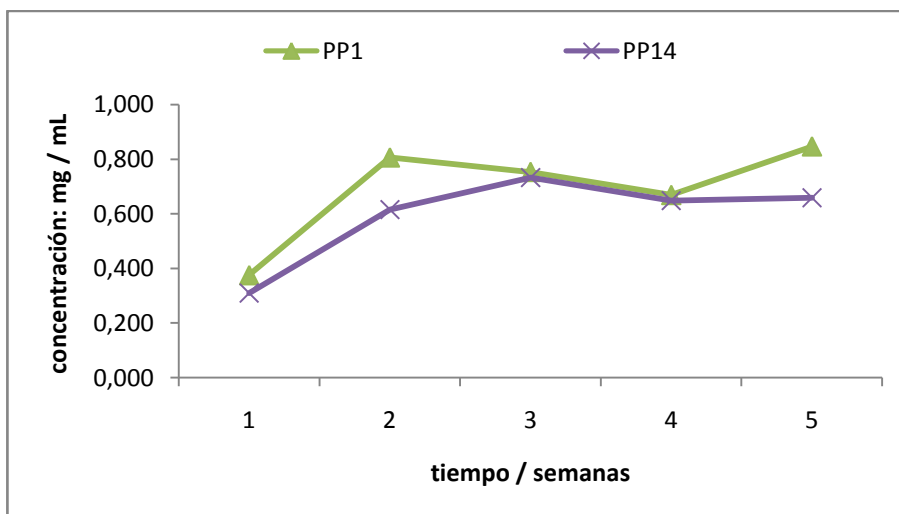


Figura N° 17: Gráficas de preparados alergénicos de polvo en propilenglicol frascos N° 1 y N° 14 (PP1 y PP14).

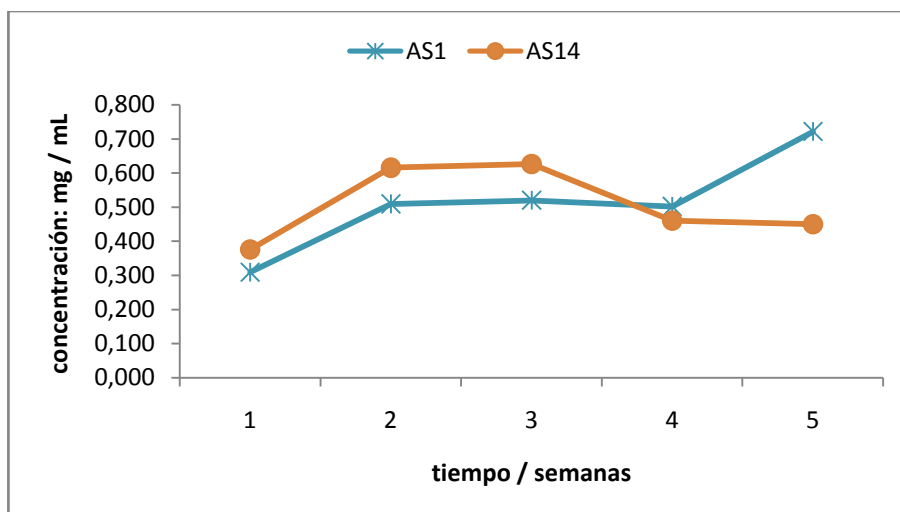


Figura N° 18: Gráficas de preparados alérgicos de abeja en sorbitol frascos N° 1 y N° 14 (AS1 y AS14).

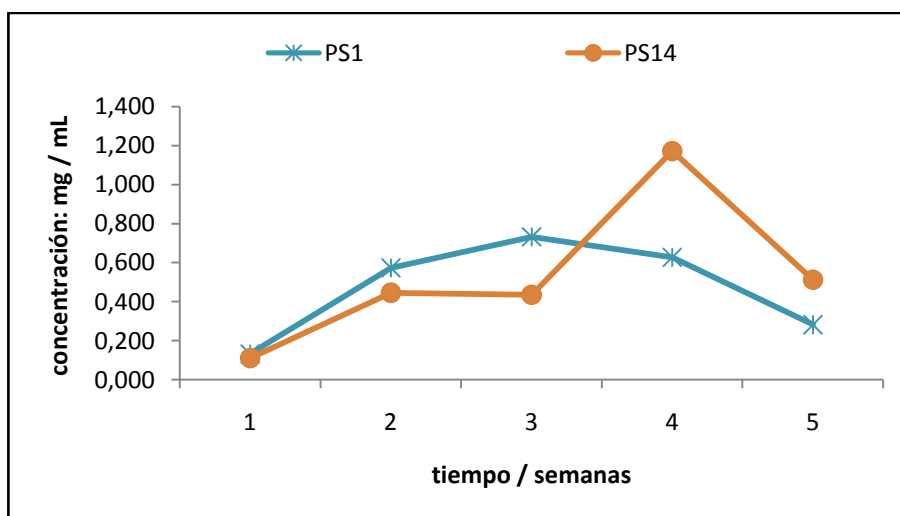


Figura N° 19: Gráficas de preparados alérgicos de polvo en sorbitol frascos N° 1 y N° 14 (PS1 y PS14).

VI. CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES:

1. Los vehículos que contienen glicerina, sorbitol y propilenglicol presentaron una alta miscibilidad en agua al hacer soluciones al 50% v/v lo que demuestra su fácil manejo.
2. En la prueba de límites microbianos para preparados alergénicos estos cumplen con los requerimientos que establece la USP 30 en lo que se refiere al Recuento Total de Bacterias Aerobias, Recuento de Hongos y Levaduras y Microorganismos Patógenos en las cuales no se obtuvo crecimiento de colonias de los microorganismos en análisis.
3. Los resultados del análisis microbiológico tanto para vehículos como para los preparados alergénicos demuestran la capacidad que tienen éstos de mantenerse sin contaminación por treinta días en las condiciones de almacenamiento durante la investigación.
4. Los resultados del análisis físico-químico para vehículos y preparados alergénicos demuestran la capacidad que éstos tienen de preservar y no degradar la proteína del alérgeno.

5. Se obtuvo resultados no conformes en la prueba físico-química posiblemente debido a la falta de homogenización de los preparados alérgicos, además la falta de impresión de la concentración en la etiqueta en los frascos emitidos de fábrica.

6. Según los resultados obtenidos en los análisis los vehículos son un sustituto para la solución de EVANS que puede ser útil para la elaboración de preparados alérgicos que se usen por vía sublingual.

VII. RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que por medio de los estudiantes de la Licenciatura en Química y Farmacia se realicen análisis de concentraciones de otros vehículos que puedan utilizarse en la formulación de los preparados alergénicos para realizar estudios comparativos tomando como base los análisis en vehículos al 50% v/v ya establecidos, con la finalidad de investigar si los vehículos son igualmente efectivos microbiológica y físicamente en las concentraciones propuestas; además de reducir los costos en la compra de vehículos y la fabricación de los preparados alergénicos.
2. A la jefatura del departamento de alergología del Hospital Nacional Rosales se recomienda que gestione el proceso de validación y análisis a las muestras para llevar el ensayo a la práctica clínica que cuente con equipo y materiales adecuados en su realización y posterior análisis microbiológico, fisicoquímico y de estabilidad.
3. Que los profesionales en Química y Farmacia puedan elaborar instrucciones de trabajo para la fabricación de preparados alergénicos realizando estudios microbiológicos, fisicoquímicos y de estabilidad aproximadamente por tres meses que es el tiempo que el paciente utiliza el producto después de su elaboración, para tener resultados de su vida útil.

4. Aplicar otros métodos además de la prueba de Biuret para cuantificar las proteínas específicas y su proceso de degradación con respecto al tiempo; ejemplo: método de Electroforesis en Gel de Poliacrilamida.
5. A los fabricantes de productos biológicos, etiquetar las concentraciones reales de los alérgenos disponibles por frasco.
6. Que los Hospitales y centros de salud públicos o privados que preparan este tipo de productos utilicen alérgenos que estén previamente estandarizados y que su etiqueta defina las cantidades de alérgeno disponible.

BIBLIOGRAFIA.

1. Álvarez Cuesta, D. E. 1998, Inmunoterapia con alérgenos: vacunas terapéuticas para las enfermedades alérgicas, Artículo de opinión de la OMS (Organización Mundial de la Salud), Pág., 1-36.
2. Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, tomo I, año 2000.
3. Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América, Farmacopea de los Estados Unidos de América, Trigésima revisión, y el Formulario Nacional, Vigésimo quinta Edición. Oficial desde el 1° de mayo de 2007.
4. Creticos, P,S y colaboradores, 2006, Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist for allergic rhinitis, The New England Journal of Medicine, vol 355 N° 14, pág. 1445-1454.
5. Fernández, E. Caldas, 2001, Presente y futuro de la inmunoterapia, Alergol Inmunol Clin 16 (Extraordinario Núm.1): 6-12.
6. Frew, A.J. 2008, Sublingual Immunotherapy, The New England Journal of Medicine, vol 358, N°21, pág. 2259- 2264.
7. Genaro, A. R., Farmacia Practica de Remington, 20° Ed, Editorial Médica Panamericana, tomo II, pág. 1872 – 1901.
8. Helman, J. 1982, Farmacotecnia Teórica y Práctica, México, Editorial Continental S.A de C.V. Tomo II, pág. 374 y 375.
9. Helman, J. 1982, Farmacotecnia Teórica y Práctica, México, Editorial Continental S.A de C.V. Tomo VI, pág. 1808.

10. Leal Q, F.J, y cols. Vacunas en Pediatría Leal Quevedo y cols, 1° Ed, Editorial Médica Panamericana, Universidad Autónoma de Madrid España, 1999.
11. Laguna, J. Piña, E. Bioquímica de Laguna, 5ª ed. Editorial el Manual Moderno, México, 2002.
12. Manterola, A.C. y otros. 1990, Presente y Futuro de las Inmunizaciones. Serie PALTEX para ejecutores de programas de salud N° 22, OPS (Oficina Sanitaria Panamericana, oficina Regional de la OMS)
13. M.D. Plaut, M, M.D. Martin D. V, 2005, Allergic Rhinitis, the New England Journal of Medicine, vol 353, N° 18, pág. 1934- 1944.
14. MOSBY/Doyma Libros S.A., "Diccionario Mosby de Medicina y Ciencias de la Salud". Versión en español traducida y adaptada de la 1a y 2a ediciones de la obra en inglés, Edición Española, Madrid, España.
15. Murray, R. K, Bioquímica de Harper, editorial El Manual Moderno, 12ª Ed. Pág. 21 hasta 49.
16. Rojas M, W. Inmunología, 13° Ed, Corporación para investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia, 2004.
17. Martínez, A. B y otros, "Inmunoterapia Sublingual en la Rinitis Alérgica Estacional. Revisión de 30 pacientes"[Internet] 2005.
<http://dialnet.unirioja.es//>
18. Saporta, D. y otros, "Efficacy comparison of multiple-antigen subcutaneous injection immunotherapy and multiple-antigen sublingual immunotherapy" [Internet] [//www.encyclopaedia.com//](http://www.encyclopaedia.com//)
19. Moreno A, C. "Inmunoterapia como Herramienta Clínica Moderna" Módulo 2: Los Extractos Alergénicos, Hospital Reina Sofía. Córdoba,

Laboratorios LETI. Todos los derechos reservados, [Internet].2009,
www.cursodeinmunoterapia.com,

20. Moreno A, C. “Inmunoterapia como Herramienta Clínica Moderna”
Módulo 5: Mecanismos de acción de la inmunoterapia específica con
alérgenos, Hospital Reina Sofía. Córdoba, Laboratorios LETI. Todos los
derechos reservados.[Internet]. 2009
www.cursodeinmunoterapia.com,

21. Moreno A, C. “Inmunoterapia como Herramienta Clínica Moderna”
Glosario, Hospital Reina Sofía. Córdoba, Laboratorios LETI. Todos los
derechos reservados. [Internet].2009
www.cursodeinmunoterapia.com

GLOSARIO

Alergia ⁽¹⁴⁾: Reacción de hipersensibilidad frente a antígenos intrínsecamente no nocivos, la mayoría de los cuales son ambientales. Las alergias se clasifican en tipos I, II, III y IV. En los tipos I, II, y III participan diferentes inmunoglobulinas, que interactúan con diversos antígenos. La alergia de tipo IV, se asocia con dermatitis de contacto y está mediada por células T, que reaccionan directamente con el antígeno produciendo inflamación local. Las alergias se pueden clasificar en las que producen reacciones inmediatas, o mediadas por anticuerpos, y las que producen reacciones tardías, que están mediadas por células. Las reacciones alérgicas inmediatas comprenden la hipersensibilidad de tipo I, II y III, así como las reacciones antígeno-anticuerpo que activen ciertas enzimas, creando un desequilibrio entre estas enzimas y sus inhibidores. Algunos síntomas frecuentes de la alergia son congestión bronquial, conjuntivitis, edema, fiebre, urticaria y vómitos. Las reacciones alérgicas graves, como la anafilaxia, pueden dar lugar a shock y muerte.

Alergenicidad ⁽²¹⁾: Capacidad de una proteína de interactuar con receptores para producir inmunoglobulina E (IgE) y unirse a ésta de forma específica.

Alergeno ⁽¹⁴⁾: Molécula de naturaleza proteica, dotada de alergenidad. Sustancia capaz de producir una reacción de hipersensibilidad pero que no es intrínsecamente nociva. Algunos alérgenos comunes son los pólenes, la caspa de los animales, el polvo doméstico, las plumas y diversos alimentos.

Generalmente el cuerpo se protege contra los alérgenos o antígenos mediante complejas reacciones químicas de los sistemas inmunes humoral y celular.

Alérgico ⁽¹⁴⁾: Relativo a la alergia, que tiene alergia.

Alergólogo ⁽¹⁴⁾: Médico especializado en el diagnóstico y tratamiento de los trastornos alérgicos.

Antígeno ⁽¹⁴⁾: Sustancia generalmente proteica, que da lugar a la síntesis de un anticuerpo y reacciona específicamente con el mismo.

Atopía ⁽⁷⁾: Es la producción de cantidades anormales de IgE en respuesta a los alérgenos ambientales comunes, tales como los ácaros del polvo, proteínas animales, polen y hongos.

Calidad de vida ⁽²¹⁾: grado en que una persona es capaz de llevar a cabo su nivel normal de actividad sin (o con mínimo) compromiso. Usualmente incluye diferentes dominios, como satisfacción vital, sentimiento de bienestar, limitación de actividades, etc.

Célula de Langerhans ⁽²¹⁾: Célula presentadora de alérgenos, de morfología dendrítica, abundante en la piel.

Conservante ⁽¹⁴⁾: producto químico u otro agente que reduce la velocidad de descomposición de una sustancia.

Desensibilización ⁽²¹⁾: proceso de pérdida de la capacidad preexistente de formar anticuerpos. Se acepta la desensibilización fisiológica por interrupción prolongada de la exposición al alérgeno, o a la desensibilización inducida con fines terapéuticos, generalmente de forma rápida, y utilizando la misma fuente

sensibilizante (habitualmente alimentos y medicamentos). Con frecuencia se discuten las similitudes y diferencias entre desensibilización e inmunoterapia, con resultados variables.

Diagnóstico ⁽¹⁴⁾: Identificación de un proceso o enfermedad mediante la evaluación específica de signos clínicos, síntomas, pruebas de laboratorio y técnicas especiales. Algunos tipos de diagnóstico son: diagnóstico clínico, diagnóstico de laboratorio, diagnóstico diferencial y diagnóstico físico.

Dosis ⁽¹⁴⁾: Cantidad de fármaco u otras sustancias que se administra en una vez.

Enfermedad ⁽¹⁴⁾: Estado anómalo de la función vital de cualquier estructura, parte o sistema del organismo. Proceso o malestar específico caracterizado por un conjunto reconocible de signos y síntomas, atribuibles a herencia, infección, dieta o entorno.

Extracto ⁽¹⁴⁾: sustancia, normalmente un ingrediente activo de una planta o tejido animal, que se prepara utilizando disolventes o evaporación, para separar la sustancia del material original.

Extracto alérgico ⁽¹⁴⁾: material biológico que contiene alérgenos, procesado para su uso con fines farmacológicos. Extracto proteico de una sustancia a la que puede ser sensible una persona. El extracto, que puede ser preparado a partir de una gran variedad de sustancias, desde alimentos a hongos, se puede utilizar como medio de diagnóstico o en el tratamiento de desensibilización.

Granulocitos ⁽¹⁴⁾: grupo de leucocitos caracterizado por la presencia de gránulos citoplásmicos. Los basófilos, eosinófilos y neutrófilos son tipos de granulocitos.

Histamina ⁽¹⁴⁾: sustancia presente en todas las células producida por el metabolismo de la histidina. Se libera en las reacciones inflamatorias alérgicas y causa dilatación de los capilares, disminución de la presión sanguínea, aumento de la secreción del jugo gástrico y contracción de los músculos lisos de los bronquios

Histocompatibilidad ⁽¹⁴⁾: compatibilidad entre los antígenos del donante y del receptor del tejido trasplantado.

Inmunización ⁽¹⁴⁾: Proceso por el que se induce o aumenta la resistencia a una enfermedad infecciosa.

Inmunogenicidad ⁽²¹⁾: capacidad de una molécula de desencadenar una respuesta inmunitaria. Generalmente se aplica a la respuesta no alérgica.

Inmunoglobulina E (IgE) ⁽¹⁴⁾: Una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo, se concentra en pulmones, piel y células de las membranas mucosas, reacciona con determinados antígenos y libera determinados mediadores químicos que producen las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, caracterizadas por pápulas enrojecidas.

Inmunoglobulina G (IgG) ⁽¹⁴⁾: una de las cinco clases de anticuerpos humorales producidos por el organismo. Es una proteína especializada, que sintetiza el organismo en respuesta a la invasión de bacterias, hongos y virus.

Inmunología ⁽¹⁴⁾: estudio de la reacción de los tejidos del sistema inmunitario del organismo a la estimulación antigénica

Inmunoterapia ⁽¹⁴⁾: tratamiento especial de las respuestas alérgicas mediante administración de dosis crecientes de los alérgenos causales, con el fin de desarrollar gradualmente inmunidad frente a ellos. La inmunoterapia se basa en la premisa de que bajas dosis de alérgeno en cuestión se fijarán a las IgG para evitar la reacción alérgica, al disminuir la acción de las IgE mediante la potenciación de la síntesis de los anticuerpos IgG bloqueadores.

Inmunoterapia local ⁽²¹⁾: generalmente se utiliza para toda inmunoterapia no sistémica (inyectable u oral).

Inmunoterapia oral ⁽²¹⁾: inmunoterapia de absorción digestiva.

Inmunoterapia sublingual ⁽²¹⁾: Inmunoterapia de administración en la mucosa oral-gingival.

Interleucinas ⁽²¹⁾: producto soluble de los linfocitos responsable de determinada función concreta de los mismos.

Linfocitos ⁽¹⁴⁾: uno de los dos tipos de leucocitos, que se originan a partir de células madre fetales y que se desarrollan en la médula. Existen dos tipos: células B y células T. Las células B circulan en forma inmadura y sintetizan anticuerpos que incluyen en sus propias membranas citoplasmáticas. Las células T: son linfocitos que han atravesado el timo y se han diferenciado en timocitos. Cuando se exponen a un antígeno, se difunden con rapidez y producen grandes cantidades de nuevas células T sensibilizadas al antígeno.

Las células T se denominan células asesinas pues secretan compuestos químicos inmunológicos esenciales, que ayudan a las células B a destruir proteínas extrañas.

Material alergénico ⁽²¹⁾: material biológico que contiene alérgenos, tal como se encuentra en la naturaleza.

Macrófagos ⁽¹⁴⁾: células fagocíticas del sistema retículo endotelial, como las células de Kupffer del hígado, los esplenocitos del bazo y los histiocitos del tejido conectivo laxo.

Presentación del antígeno ⁽²¹⁾: Fase de la respuesta inmunitaria en que el antígeno es captado por una célula cualificada y procesado adecuadamente para que pueda activar al linfocito.

Prevención ⁽¹⁴⁾: cualquier acción dirigida a prevenir la enfermedad y a favorecer la salud para evitar la necesidad de una asistencia sanitaria primaria, secundaria y terciaria.

Reacción local ⁽²¹⁾: efecto adverso de la inmunoterapia en el lugar de su administración. Generalmente consiste en inflamación y prurito.

Reacción sistémica ⁽²¹⁾: efecto adverso de la inmunoterapia a distancia de su lugar de administración, como consecuencia de la absorción del alérgeno. Las reacciones sistémicas más frecuentes son las cutáneo-mucosas y las respiratorias.

Recidiva, recaída, recurrencia ⁽²¹⁾: recrudecimiento no coyuntural de los síntomas que el paciente experimenta tras una fase de mejoría.

Sensibilización ⁽¹⁴⁾: reacción adquirida en la cual se desarrollan anticuerpos específicos en respuesta a un antígeno. Capacidad de un individuo de fabricar IgE tras el contacto con un alérgeno.

Sintomatología ⁽¹⁴⁾: ciencia que estudia los síntomas de la enfermedad en general o los síntomas de una enfermedad específica.

Solución ⁽¹⁴⁾: mezcla de una o más sustancias disueltas en otra sustancia. Las moléculas de cada una de las sustancias se dispersan de forma homogénea y no varían químicamente. Una solución puede ser: gaseosa, líquida o sólida.

Test de provocación órgano específico ⁽¹⁹⁾: examen de la respuesta de un órgano a la exposición a un extracto alérgico sobre el mismo.

Tolerancia ⁽²¹⁾: proceso opuesto a la sensibilización, que se adquiere de forma natural o inducida.

Tratamiento ⁽¹⁴⁾: asistencia y cuidados proporcionados a un paciente para combatir, prevenir o mejorar la enfermedad, trastorno o lesión.

Tratamiento farmacológico ⁽²¹⁾: tratamiento llevado a cabo mediante la utilización de fármacos (sustancia química purificada empleada en el tratamiento, la curación, la prevención o el diagnóstico de una enfermedad, o para evitar la aparición de un proceso fisiológico no deseado).

Vacuna ⁽¹⁴⁾: suspensión de microorganismos atenuados o muertos administrada por vía intradérmica, intramuscular, oral o subcutánea para inducir inmunidad activa frente a enfermedades infecciosas.

Vacunación ⁽¹⁴⁾: cualquier inyección de microorganismos atenuados, como bacterias, virus o rickettsias, administradas para inducir o reducir los efectos de enfermedades infecciosas asociadas.

ANEXOS

ANEXO N° 1.
CERTIFICADOS DE MATERIAS PRIMAS

Certificate of Analysis



1.04094.0000 Glycerol about 87% GR for analysis

Batch Z848794

	Batch Values	
Assay (GC, calc. on hydrous substance)	87	%
Identity (IR-spectrum)	passes test	
Free alkali (as NH ₃)	≤ 0.0005	%
Free acid (as CH ₃ COOH)	≤ 0.002	%
Density (d 20/4)	1.221 - 1.231	
Chloride (Cl)	≤ 0.0001	%
Sulphate (SO ₄)	≤ 0.0005	%
Heavy metals (as Pb)	≤ 0.0001	%
Aldehydes	≤ 10	ppm
Fe (Iron)	≤ 0.0001	%
NH ₄ (Ammonium)	≤ 0.0005	%
Fatty Esters (as glycerintributyrate)	≤ 0.05	%
Readily carbonizable substances	passes test	
Sulfated ash	≤ 0.005	%
Water	12 - 14	%

Test date (DD.MM.YYYY): 08.09.2005
Minimum shelf life (DD.MM.YYYY): 30.09.2010

Dr. Joachim Ruf

responsible laboratory manager quality control

This document has been produced electronically and is valid without a signature

For favor note que el Certificado de Análisis está siempre cómodamente disponible online via www.worldaccount.basf.com

Fax No 0050350224457698

DISTRIBUIDORA UNIDA
INDUSTRIAL S.A. DE C.V.
29 CALLE ORIENTE No. 730
2439
COL. LA RABIDA
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, C.A.
El Salvador

2009-09-21
E-CPB/Q
Oliver Wirthwein
+49 621 60-22360
Certificado No 3296
Hoja 3 de 3

Certificado de analisis de acuerdo a DIN 55350-18-4.1.2

1,2-PROPILENGLICOL USP

220KG PE-Bidon con tapón
Vuestra Orden
OC 100763 / PO 19960
00000000052705412

Material 52705412
Pedido 3005441278 000010
Entrega 3087594850 000010
Lote 73806016K0
Lote/Canti 17600.000 KG
Total 17600.000 KG
Transporte TTNU3154076

Pruefmerkmal Spec. characteristic	Pruefergebnis Test result	Spezifikation Specification
Reduzierende Substanzen Reducing substances (PhEur)	entspricht conforms	muss entsprechen must conform
Fluechtige org. Verunreinigungen Organic Volatile Impurities (USP)	entspricht conforms	muss entsprechen must conform
Hazen Farbzahl Hazen colour number (DIN EN 1557)	entspricht conforms	<=10

No organic volatile impurities cited in USP-NF (1,4-Dioxane, Benzene, Chloroform, Methylenchloride, Trichlorethylene) resp. residual solvents cited in PhEur are likely to be present.

1,2-Propylenglykol erfuehlt die Reinheitsanforderungen von USP und PhEur.
1,2-Propylene glycol fulfills the cleanness requirements of USP and PhEur.
Bestimmungsmethoden sind in den Arzneibuchmonographien enthalten.
Testing Methods are listed in the pharmacopoeia.
Die Pruefwerte stammen aus der laufenden Produktion und wurden an Proben aus dem Vorratstank ermittelt. / The test values are taken from current production and have been determined using samples from the storage tank.

Manufacturer: BASF SE
Carl Bosch Str. 38
67056 Ludwigshafen
Germany

BASF SE
This document was created automatically and is valid without signature.

Los datos indicados corresponden a la calidad del producto contractualmente acordada en el momento de la transmisión del riesgo y son comprobados regularmente respondiendo a nuestras medidas para el aseguramiento de la calidad. Dichos datos, así como las propiedades de las muestras de productos no constituyen ningún tipo de garantía relativa a las propiedades del producto ni apuntan la idoneidad del producto para determinados fines o aplicaciones, no pudiéndose derivar por ello de dichas indicaciones derechos de indemnización.



The Chemical Company

Certificate of Analysis

BASF SE

For favor note que el Certificado de Análisis está siempre cómodamente disponible online via www.worldaccount.basf.com

Fax No 0050350224457698

DISTRIBUIDORA UNIDA
INDUSTRIAL S.A. DE C.V.
29 CALLE ORIENTE No. 730
2439
COL. LA RABIDA
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, C.A.
El Salvador

2009-09-21
E-CPB/Q
Oliver Wirthwein
+49 621 60-22360
Certificado No 3296
Hoja 2 de 3

Certificado de analisis de acuerdo a DIN 55350-18-4.1.2

1,2-PROPILENGLICOL USP

220KG PE-Bidon con tapón
Vuestra Orden
OC 100763 / PO 19960
000000000052705412

Material 52705412
Pedido 3005441278 000010
Entrega 3087594850 000010
Lote 73806016K0
Lote/Canti 17600.000 KG
Total 17600.000 KG
Transporte TTNU3154076

Pruefmerkmal Spec. characteristic	Pruefergebnis Test result	Spezifikation Specification
Sulfat Sulfate (IC)	< 1 mg/kg	max. 60 mg/kg
Arsen Arsenic	< 1 mg/kg	max. 3 mg/kg
Schwermetalle 1) Heavy metals 1)	< 5 mg/kg	max. 5 mg/kg
Dimere und Polymere Dimers and Polymers (CGC)	0,02 g/100g	max. 0,1 g/100g
1,3-Propandiol (CGC)	< 50 mg/kg	max. 100 mg/kg
Organische Chlorverb. als Cl Organic chlorine compounds as Cl	< 1 mg/kg	max. 1 mg/kg
Sauer reag. Substanzen Acidic compounds (PhEur)	entspricht conforms	muss entsprechen must conform
Saeurezahl Acid value	entspricht conforms	max. 0,019 mg KOH/ml
Oxidierende Substanzen Oxidizing substances (PhEur)	entspricht conforms	muss entsprechen must conform

1) wird periodisch ueberprueft / tested periodically

Los datos indicados corresponden a la calidad del producto contractualmente acordada en el momento de la transmisión del riesgo y son comprobados regularmente respondiendo a nuestras medidas para el aseguramiento de la calidad. Dichos datos, así como las propiedades de las muestras de productos no constituyen ningún tipo de garantía relativa a las propiedades del producto ni apuntan la idoneidad del producto para determinados fines o aplicaciones, no pudiéndose derivar por ello de dichas indicaciones derechos de indemnización.



CARGILL KREFELD B/P
CERESTARSTRASSE 2
D-47809 KREFELD.

1604156

Fax: 00492151575774

Certificate of Analysis/Conformity

Customer : DISTRIBUIDORA DEL CARIBE S.A. DE C.V.
Address : COLONIA FLOR BLANCA EL PROGRESO
SV-2362 A SAN SALVADOR - EL SALVADOR
f.a.o. :

Product : C*PharmSorbidex NC 16205
Product description : Sorbitol syrup
Lot number : 03150440
Container number : SUDU 171778-B
Contract number : 17050327
Production date : 08 OCT 2009
Shipment date : 08-oct-2009

Volume (kg) : 14144.0
Order number : 17385148
Packing description : 5X272 M5X272
Customer reference : SV.E-77,2009
Number of units : 52
Shelf life (mth) : 24

Producing Plant: Cargill Deutschland GmbH - Cerestar Strasse 2 - 47809 Krefeld Germany - Tel: +49 (0)2151 575 214 Fax +49 (0)2151 575 884

Analysis

Parameter	Unit	Result	Min	Max
Dry substance	%	70.0	69.8	70.9
Reducing sugars on d.b.	%	0.13		0.20
Mannitol on d.b.	%	3.8	2.0	6.0
Sorbitol on d.b.	%	77.7	74.0	79.0

We herewith confirm that this batch has been tested to the quality requirements. Test results are within the agreed limits.

Conformity

Parameter	Unit	Min	Max
Identification A Ph.Eur. HPLC		pass test	pass test
Identification B Ph.Eur. angle of rot.		pass test	pass test
Identification C Ph.Eur. vis.aspect		pass test	pass test
Appearance of solution Ph.Eur.		pass test	pass test
Conductivity Ph.Eur.	μ S/cm		10
Redu.sugars after hydrolysis Ph.Eur.	%		9.3
Red. sugars Ph.Eur.	%		0.2
Water Ph.Eur.	%	28.0	32.0
Sorbitol, assay Ph.Eur. on d.b.	%	72.0	92.0
Tot. bacteria (viable) Ph.Eur. /g			1000
Tot. fungi (viable) Ph.Eur. /g			100
Lead Ph.Eur.	ppm		0.5
Nickel Ph.Eur.	ppm		1.0

We herewith confirm that this batch is in compliance with the quality requirements.



The Chemical Company

Certificate of Analysis

BASF SE

For favor note que el Certificado de Análisis está siempre cómodamente disponible online via www.worldaccount.basf.com

Fax No 0050350224457698

DISTRIBUIDORA UNIDA
INDUSTRIAL S.A. DE C.V.
29 CALLE ORIENTE No. 730
2439
COL. LA RABIDA
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, C.A.
El Salvador

2009-09-21
E-CPB/Q
Oliver Wirthwein
+49 621 60-22360
Certificado No 3296
Hoja 1 de 3

Certificado de analisis de acuerdo a DIN 55350-18-4.1.2

1,2-PROPILENGLICOL USP
220KG PE-Bidon con tapón
Vuestra Orden
OC 100763 / PO 19960
00000000052705412

Material 52705412
Pedido 3005441278 000010
Entrega 3087594850 000010
Lote 73806016K0
Lote/Canti 17600.000 KG
Total 17600.000 KG
Transporte TTNU3154076

Production date: August 2009

Expiry date: August 2010

Pruefmerkmal Spec. characteristic	Pruefergebnis Test result	Spezifikation Specification
Identitaet Identity (IR)	entspricht conforms	muss entsprechen must conform
Aussehen Appearance (PhEur 2.2.1 + 2.2.2II)	entspricht conforms	muss entsprechen must conform
Reinheit Purity (CGC)	> 99,9 %	min. 99,8
Relative Dichte d(25/25) Specific gravity(25/25)	1,036	1,035 - 1,037
Relative Dichte d(20/20) Specific gravity d(20/20)	1,039	1,035 - 1,040
Brechungsindex, 20 Grad C Refractive Index, 20 deg C (PhEur)	1,433	1,431 - 1,433
Wasser Water (Karl-Fischer-Titration)	< 0,05 %	max. 0,2 %
Sulfatasche Residue on ignition (USP)	< 10 mg/kg	max. 70 mg/kg
Chlorid Chloride	< 1 mg/kg	max. 70 mg/kg

Los datos indicados corresponden a la calidad del producto contractualmente acordada en el momento de la transmisión del riesgo y son comprobados regularmente respondiendo a nuestras medidas para el aseguramiento de la calidad. Dichos datos, así como las propiedades de las muestras de productos no constituyen ningún tipo de garantía relativa a las propiedades del producto ni apuntan la idoneidad del producto para determinados fines o aplicaciones, no pudiéndose derivar por ello de dichas indicaciones derechos de indemnización.

ANEXO Nº 2
MONOGRAFIAS DE MATERIAS PRIMAS.

MONOGRAFIAS DE MATERIAS PRIMAS

GILICERINA (8)

La glicerina es un solvente farmacéutico valioso que da lugar a la formación de soluciones permanentes y concentradas. La gran higroscopicidad del glicerol hace que las farmacopeas permitan porcentajes variables de agua (Codex 3%, USP 5%).

Algunas mezclas binarias y ternarias utilizadas en farmacia incluyen el glicerol como cosolvente. El sistema agua-glicerol es un vehículo común, disuelve bien saborizantes tipo vainillina (hasta 5% en glicerol 50%), y admite jarabes de glucosa y también azúcar común (hasta 45% p/p en glicerol 50%). El sistema etanol-glicerol, puro o acuoso, se emplea igualmente (digitálicos, barbitúricos, etc.) La glicerina se usa como el único solvente para preparación de soluciones óticas.

Las propiedades de combinación que posee el glicerol le confiere una serie de usos industriales, farmacéuticos y cosméticos. Entre sus propiedades destacan su baja volatilidad, alta viscosidad, gran higroscopicidad, capacidad de drenar agua y retenerla –poder humectante y emoliente-, su sabor dulce (60% del de la sacarosa), su poder solvente y su atoxicidad.

Las formas posológicas en que interviene el glicerol son numerosas: cápsulas rígidas y blandas (de glicogelatina), colutorios, gargarismos, jarabes, soluciones, colirios, gotas oftálmicas, supositorios, óvulos, pomadas, cremas y pastas.

Es frecuente su empleo como solvente o cosolvente en soluciones orales e inyectables, elixires y pociones; se destacan los inyectables de barbitúricos. La facultad de disolver proteínas sin desnaturalizarlas y su ligero poder antiséptico, lo ubican como vehículo de enzimas, proteolíticas, gonadotropina coriónica y algunos antígenos (vacuna, tuberculina, etc.).

La incompatibilidad más notoria que posee el glicerol en los sistemas farmacéuticos es frente a los oxidantes, aún los suaves como el óxido de zinc. La modificación del PH del medio cuando se pone en contacto el glicerol con los ácidos bóricos o sus sales; tal modificación puede perjudicar eventualmente a un tercer ingrediente de las formulaciones.

Preserva dos veces su volumen. Por lo tanto no necesita conservantes en solución al 50%. Por su sabor dulce no necesita un edulcorante. Produce soluciones neutras al tornasol. Miscible en agua, alcohol y metanol, un gramo es soluble en unos 12 mL de acetato de etilo y unos 15 mL en acetona, insoluble en cloroformo, éter y aceites fijos y volátiles.

CALIDADES.

Actualmente se venden en el mercado diversas calidades de glicerina, como glicerina de alta densidad, glicerina para dinamita, glicerina amarilla destilada y glicerina USP. Por lo consiguiente las especificaciones varían según los consumidores y según el uso.

Glicerina USP es incolora como el agua y satisface los requerimientos impuestos por la farmacopea. Es apropiada para usarla en alimentos, en productos farmacéuticos y cosméticos destinados al consumo humano.

Productos alimenticios, medicinas y cosméticos, la o toxicidad es un requerimiento fundamental; por ello, la glicerina ha sido desde hace mucho tiempo un ingrediente importante en la medicina como ingrediente de muchas tinturas y elixires. En cosmética para conservar la piel suave en cremas y jabones.

PROPILENGLICOL ⁽⁸⁾

Líquido claro, incoloro, sabor ardiente, agridulce, sin olor aparente a temperatura ambiente, pero con ligera fragancia si se le entibia. Es muy higroscópico y expuesto a las condiciones ambientales, absorbe agua atmosférica. El propilenglicol se mezcla con agua, acetona y cloroformo en todas proporciones. Es capaz de disolver, en baja proporción, algunas sustancias minerales como el yodo, yoduro de potasio, cloruro de sodio, carbonato monosódico, sulfato ferroso, y numerosas sustancias orgánicas en virtud de su estructura se considera una molécula polar. Solubiliza numerosas esencias, terpenos, colorantes.

La estabilidad química del propilenglicol, en las condiciones normales de manejo, es buena, aunque en altas temperaturas es oxidable y también deshidratable.

El propilenglicol como solvente se utiliza en numerosas formas orales – especialmente en gotas- de fármacos que son hidrolizables o bien que no son hidrosolubles. Debe tenerse presente que en soluciones diluidas con agua, eventualmente y tal como sucede en el cloranfenicol, la hidrólisis marcha tan rápido en presencia de propilenglicol.

En todo caso la conveniencia del uso como solvente o cosolvente la decidirán en definitiva los estudios sobre estabilidad del fármaco y la forma posológica.

Preserva igual que el alcohol al 18%. Por lo tanto hay que evaluar si preserva lo suficiente las vacunas antialérgicas. Por su sabor dulce no necesita un edulcorante.

SORBITOL:(8)

Posee sabor dulce, polvo blanco, gránulos o copos higroscópicos, Solubilidad: soluble en agua (1:0.45), poco soluble en alcohol, metanol o ácido acético insoluble en éter. pH: 7.0 en solución al 1%. Es una molécula de glucosa con dos hidrógenos agregados. Es clasificado como un alcohol polihídrico de sucrosa.

Incompatibilidades: Con agentes oxidantes fuertes. Preparaciones que contengan concentraciones superiores al 40% en alcohol. La adición de polietilenglicoles líquidos a la solución de sorbitol con agitación fuerte, produce una masa cerosa, soluble en agua, con punto de fusión de 40°C.

Usos farmacéuticos y porcentaje: Se usa como sustituto del propilenglicol y de la glicerina. En preparados farmacéuticos orales “sin azúcar” como edulcorante se emplea hasta el 90%.

ANEXO N° 3
ESQUEMAS DE PROCEDIMIENTOS DE ANALISIS
MICROBIOLÓGICOS.

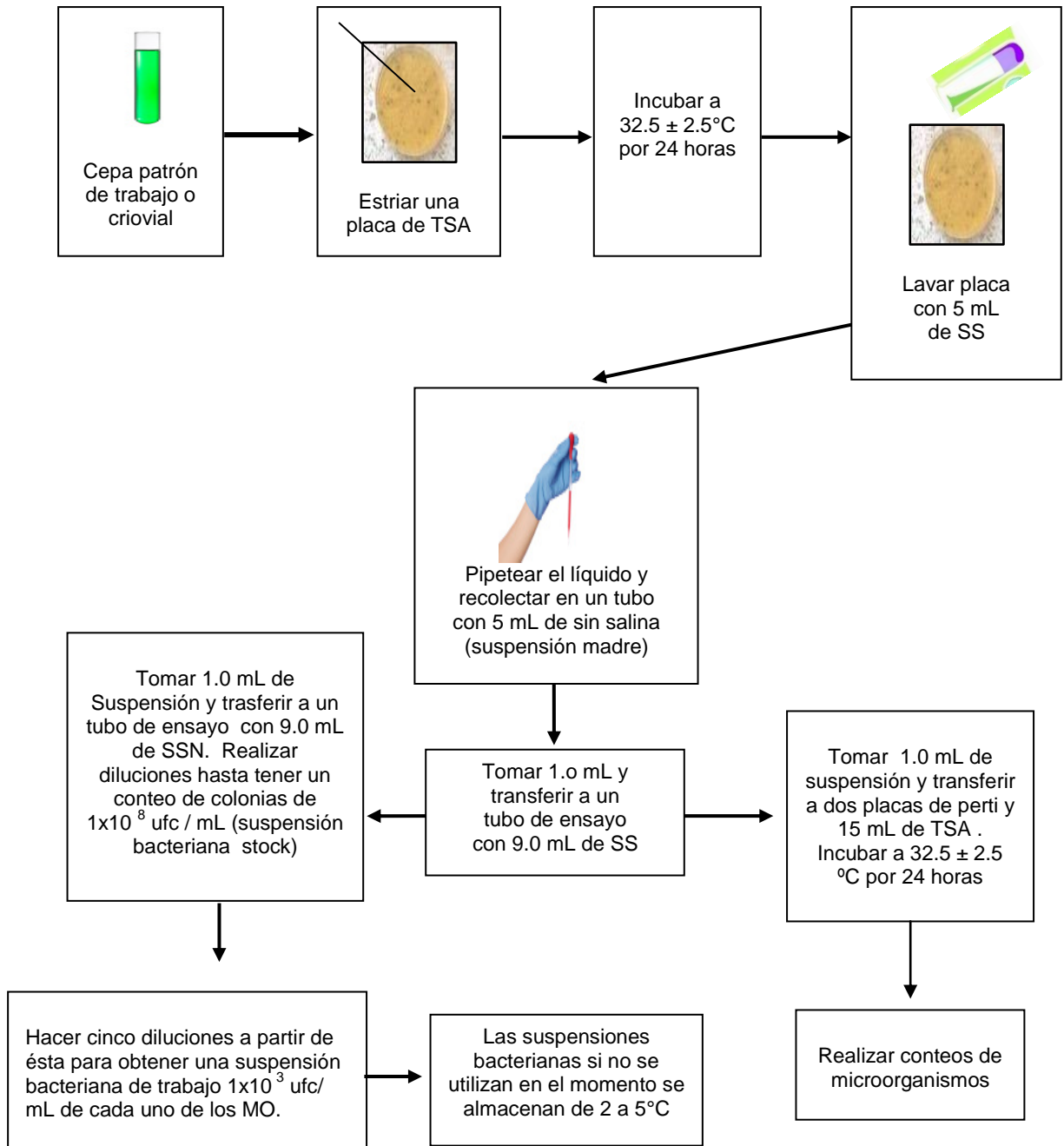


Figura N° 20: Preparación de inóculos para: *Escherichia coli*, *pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhimorium* y *Staphylococcus aureus*.

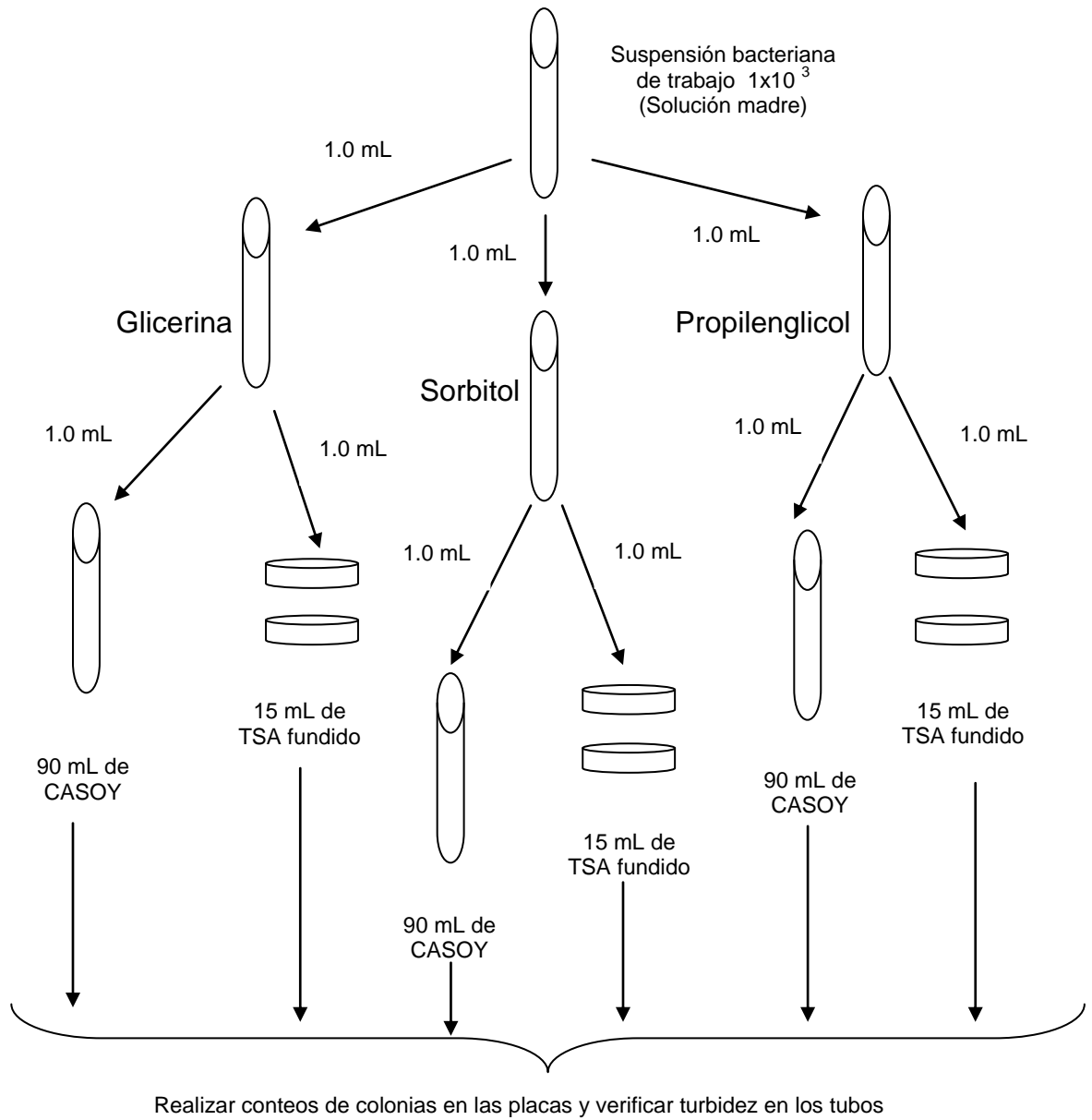


Figura N° 21: Idoneidad del método: Contaminación de materia prima

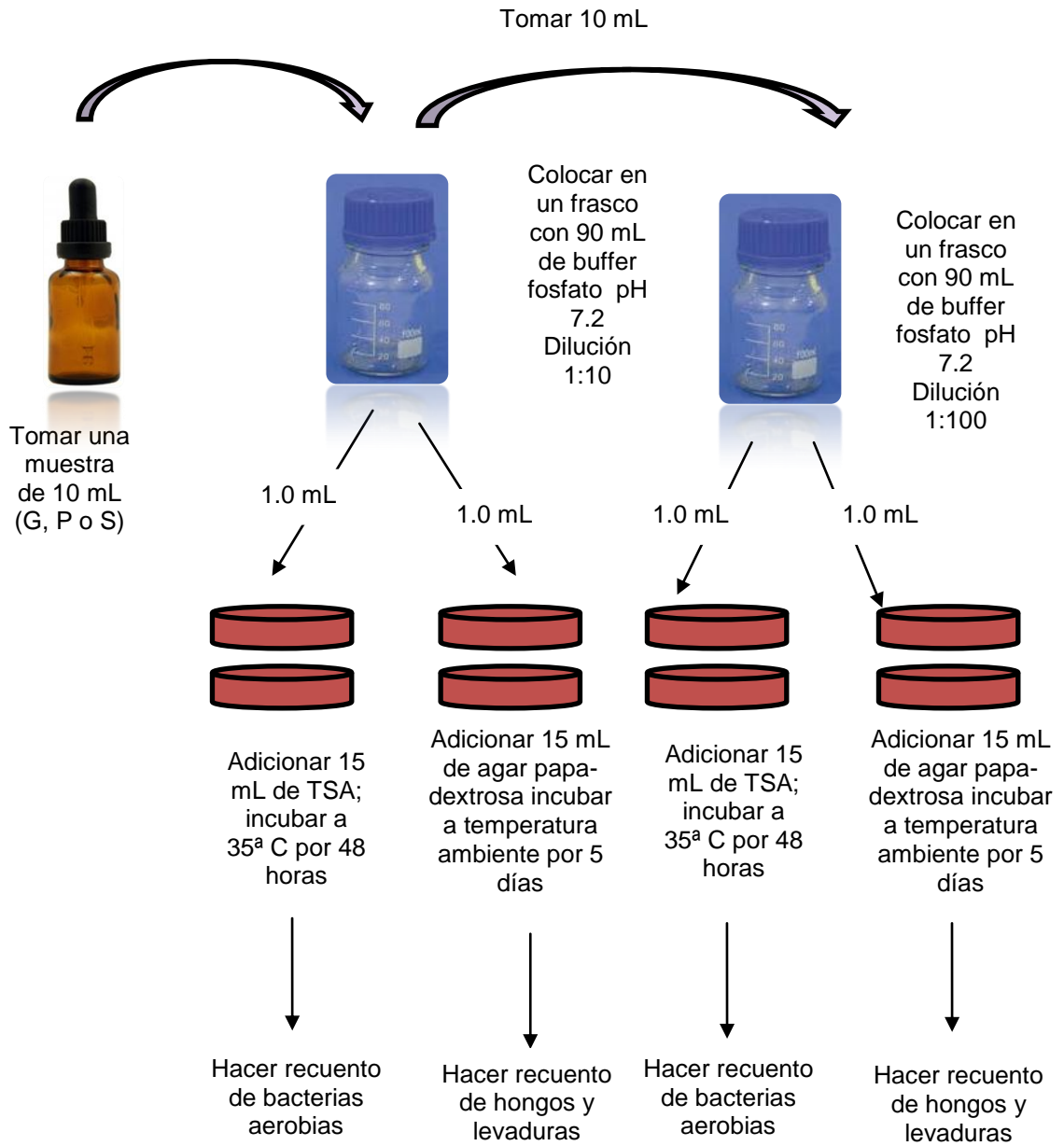


Figura N° 22: Limites microbianos de materia prima

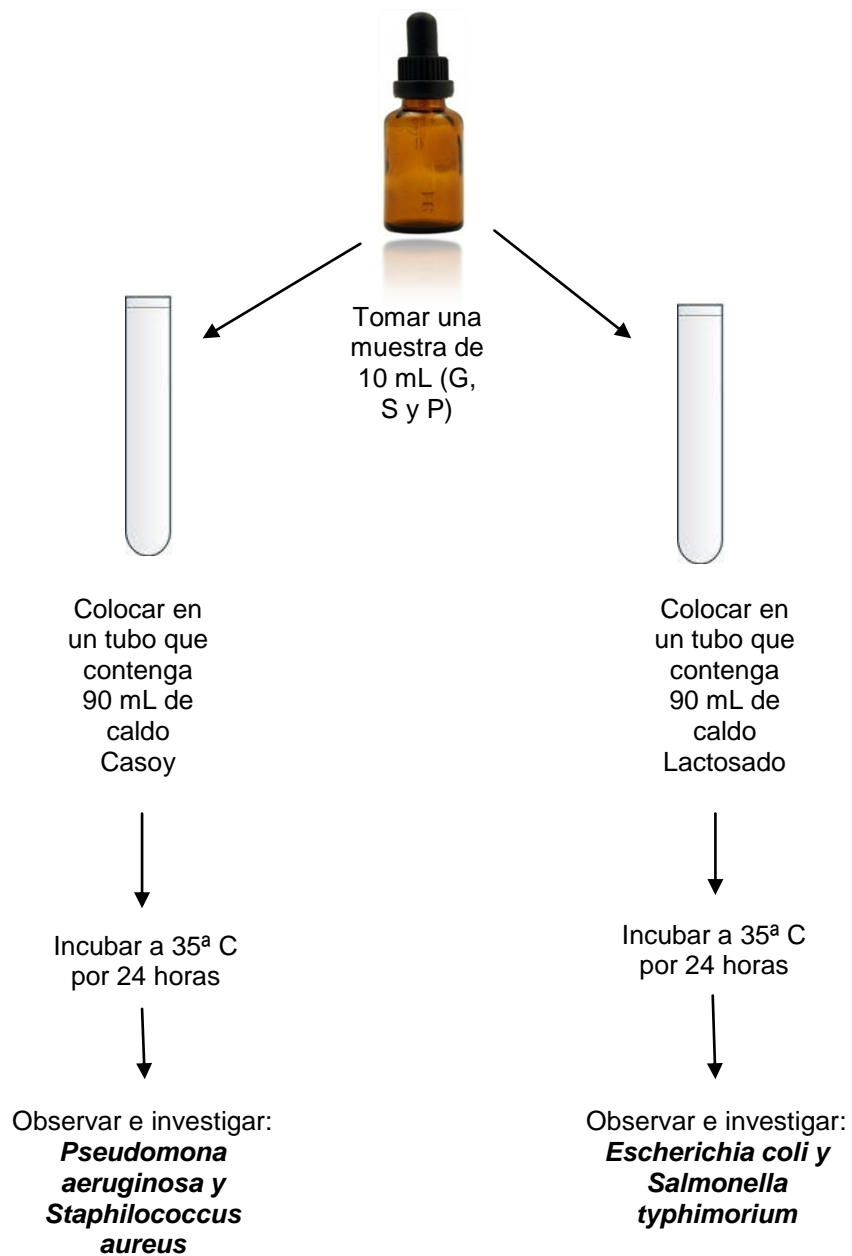


Figura N° 23: Límites microbianos: Materia prima.

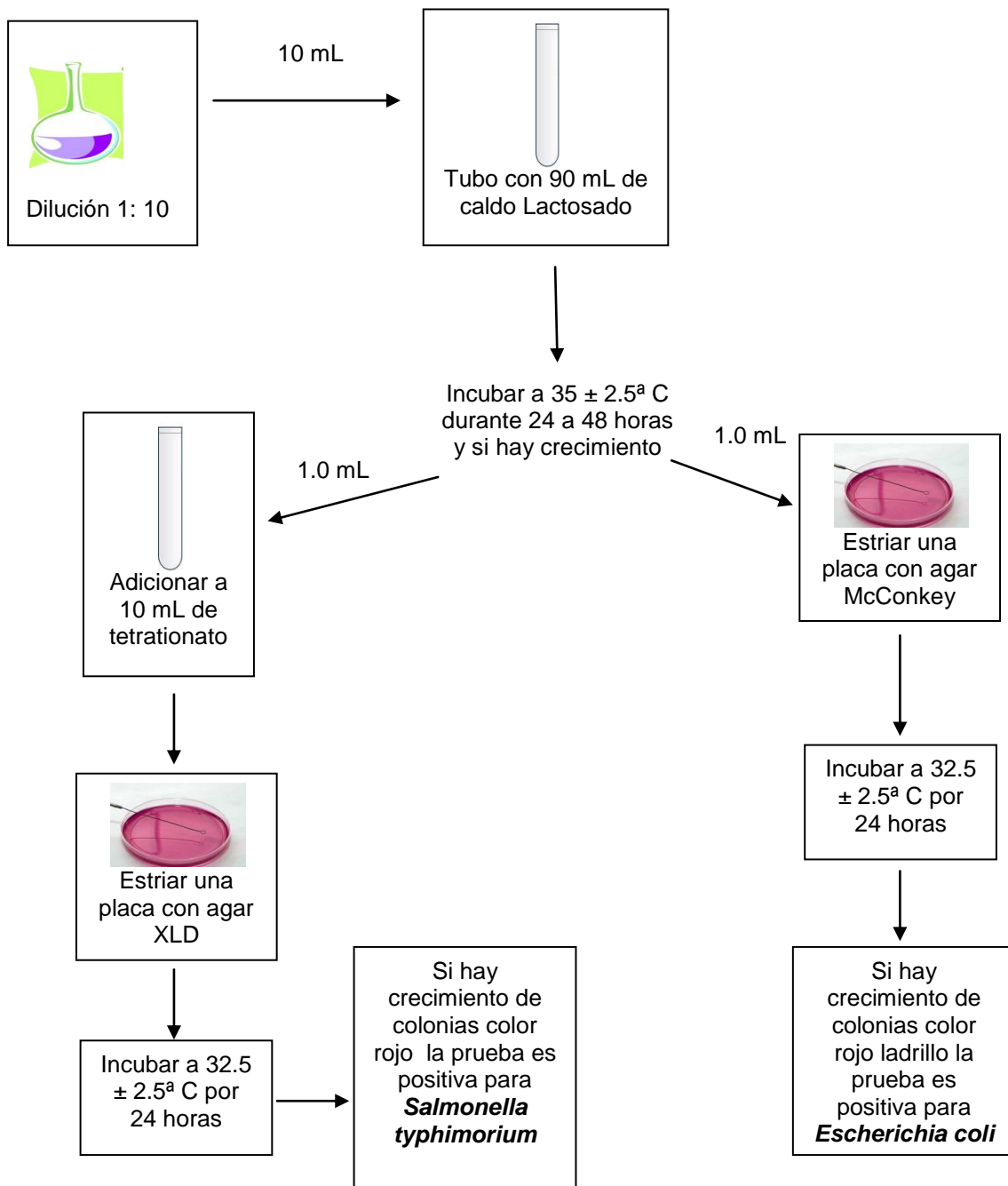


Figura N° 24: Prueba para determinar ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella typhimorium*.

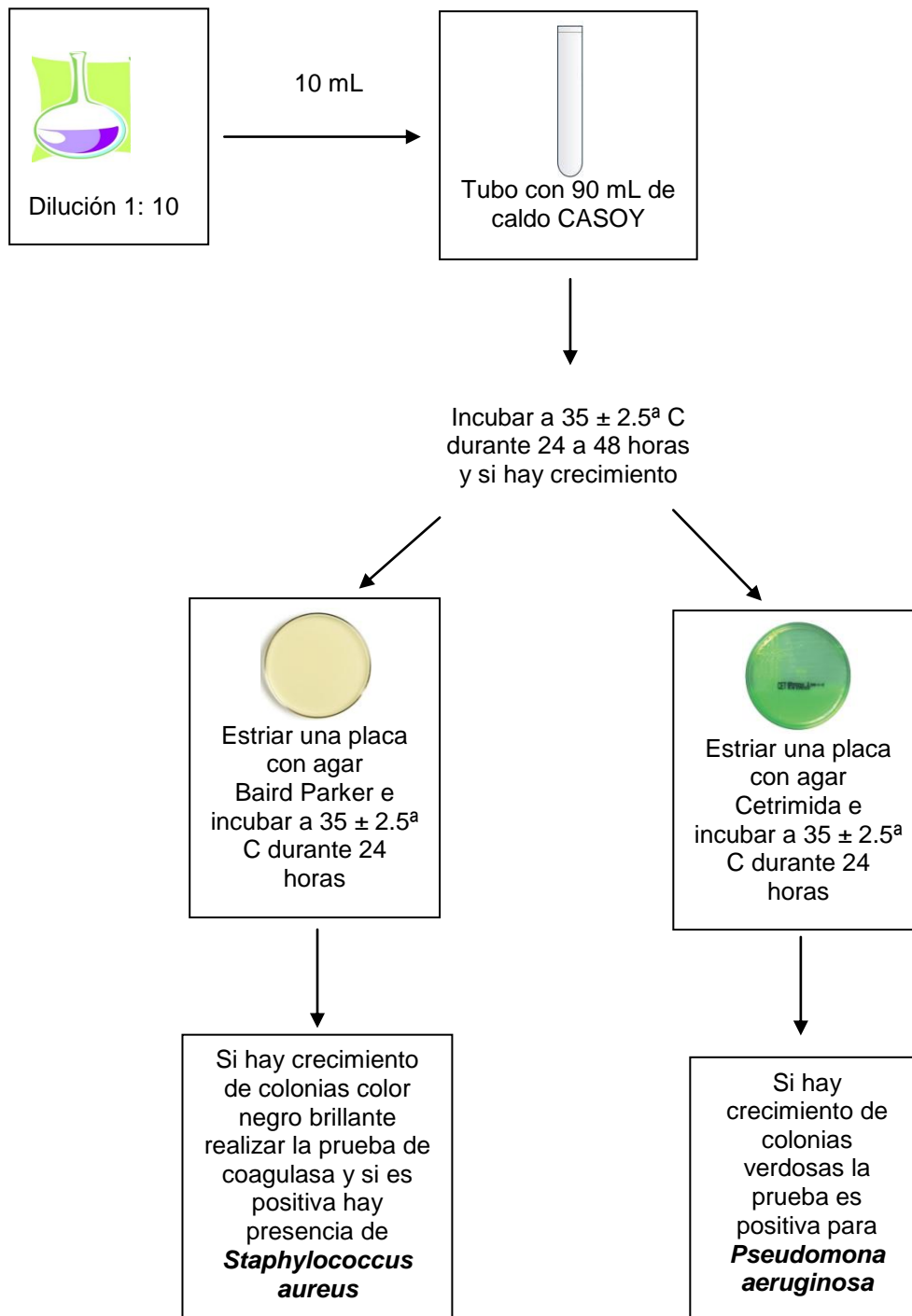


Figura N° 25: Prueba para determinar ausencia de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

ANEXO N° 4
ESQUEMA DE PREPARACION DE VACUNAS ALERGÉNICAS.

**Cuadro N° 3. PREPARACION DE VACUNA ALERGENICA FORMA
TRADICIONAL.**

N° de frasco del alérgeno	Tomar alícuotas de alérgeno en Dilución 1:1000
FRASCO # 1	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 2	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 3	0.20 mL de c/alérgeno
FRASCO # 4	0.30 mL de c/alérgeno
FRASCO # 5	0.40 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONES AL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA, PROPILENGLICOL Y SORBITOL.	
N° de frasco del alérgeno	Tomar alícuotas de alérgeno en Dilución 1:100
FRASCO # 6	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 7	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 8	0.20 mL de c/alérgeno
FRASCO # 9	0.30 mL de c/alérgeno
FRASCO # 10	0.40 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONES AL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA, PROPILENGLICOL Y SORBITOL.	
N° de frasco del alérgeno	Tomar alícuotas de alérgeno en Dilución 1:10
FRASCO # 11	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 12	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 13	0.20 mL de c/alérgeno
FRASCO # 14	0.20 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONES AL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA, PROPILENGLICOL Y SORBITOL.	

**CUADRO N° 4: PREPARACION DE VACUNA ALERGENICA PARA
ALERGENO ABEJA 1:10**

N° de Frasco del alérgeno.	Tomar alícuotas de alérgeno en Dilución 1:1,000,000.
FRASCO # 1 [5×10^{-6} mg/mL]	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 2 [1×10^{-5} mg/mL]	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 3 [2×10^{-5} mg/mL]	0.20 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONESAL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA. PROPILENGLICOLY SORBITOL	
N° de Frasco del alérgeno	Tomar alícuotas de alérgeno en Dilución 1:100,000.
FRASCO # 4 [5×10^{-5} mg/mL]	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 5 [1×10^{-4} mg/mL]	0.1 mL de c/alérgeno
FRASCO # 6: [2×10^{-4} mg/mL]	0.2 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONESAL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA. PROPILENGLICOL Y SORBITOL	
N° de Frasco del alérgeno	Tomar alícuotas de alérgeno en Dilución 1:10,000
FRASCO # 7: [5×10^{-4} mg/mL]	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 8: [1×10^{-3} mg/mL]	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 9: [2×10^{-3} mg/mL]	0.20 mL de c/alérgeno
FRASCO # 10: [3×10^{-3} mg/mL]	0.30 mL de c/alérgeno
FRASCO # 11: [4×10^{-3} mg/mL]	0.40 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONESAL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA. PROPILENGLICOL Y SORBITOL	
N° de Frasco del alérgeno	Tomar alícuotas de alérgeno en Dilución 1:1000
FRASCO # 12: [5×10^{-3} mg/mL]	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 13: [1×10^{-2} mg/mL]	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 14: [2×10^{-2} mg/mL]	0.20 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONESAL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA. PROPILENGLICOL Y SORBITOL	

**Cuadro N° 5: PREPARACION DE VACUNA ALERGENICA PARA
ALERGENO POLVO 1:5.**

N° de Frasco del alérgeno	TOMAR ALICUOTAS DE ALERGENO EN DILUCION 1:500.
FRASCO # 1 [1×10^{-2} mg/mL]	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 2 [2×10^{-2} mg/mL]	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 3 [4×10^{-2} mg/mL]	0.20 mL de c/alérgeno
FRASCO # 4 [6×10^{-2} mg/mL]	0.30 mL de c/alérgeno
FRASCO # 5 [8×10^{-2} mg/mL]	0.40 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONES AL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA. PROPILENGLICOL Y SORBITOL	
N° de Frasco del alérgeno	TOMAR ALICUOTAS DE ALERGENO EN DILUCION 1:50
FRASCO # 6 [1×10^{-1} mg/mL]	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 7 [2×10^{-1} mg/mL]	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 8 [4×10^{-1} mg/mL]	0.20 mL de c/alérgeno
FRASCO # 9 [6×10^{-1} mg/mL]	0.30 mL de c/alérgeno
FRASCO # 10 [8×10^{-1} mg/mL]	0.40 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONES AL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA. PROPILENGLICOL Y SORBITOL	
N° de Frasco del alérgeno	TOMAR ALICUOTAS DE ALERGENO EN DILUCION 1:5
FRASCO # 11 [1.0 mg/mL]	0.05 mL de c/alérgeno
FRASCO # 12 [2.0 mg/mL]	0.10 mL de c/alérgeno
FRASCO # 13 [4.0 mg/mL]	0.20 mL de c/alérgeno
FRASCO # 14 [4.0 mg/mL]	0.20 mL de c/alérgeno
HACER SUMATORIA DE ALERGENOS Y LLEVAR A VOLUMEN DE 10 mL CON SOLUCIONES AL 50% DE CADA VEHICULO: GLICERINA. PROPILENGLICOL Y SORBITOL	

ANEXO Nº 5
PREPARACION DE PREPARADO ALERGENICO
FRASCO Nº 1 Y Nº 14 DE CADA ALERGENO.

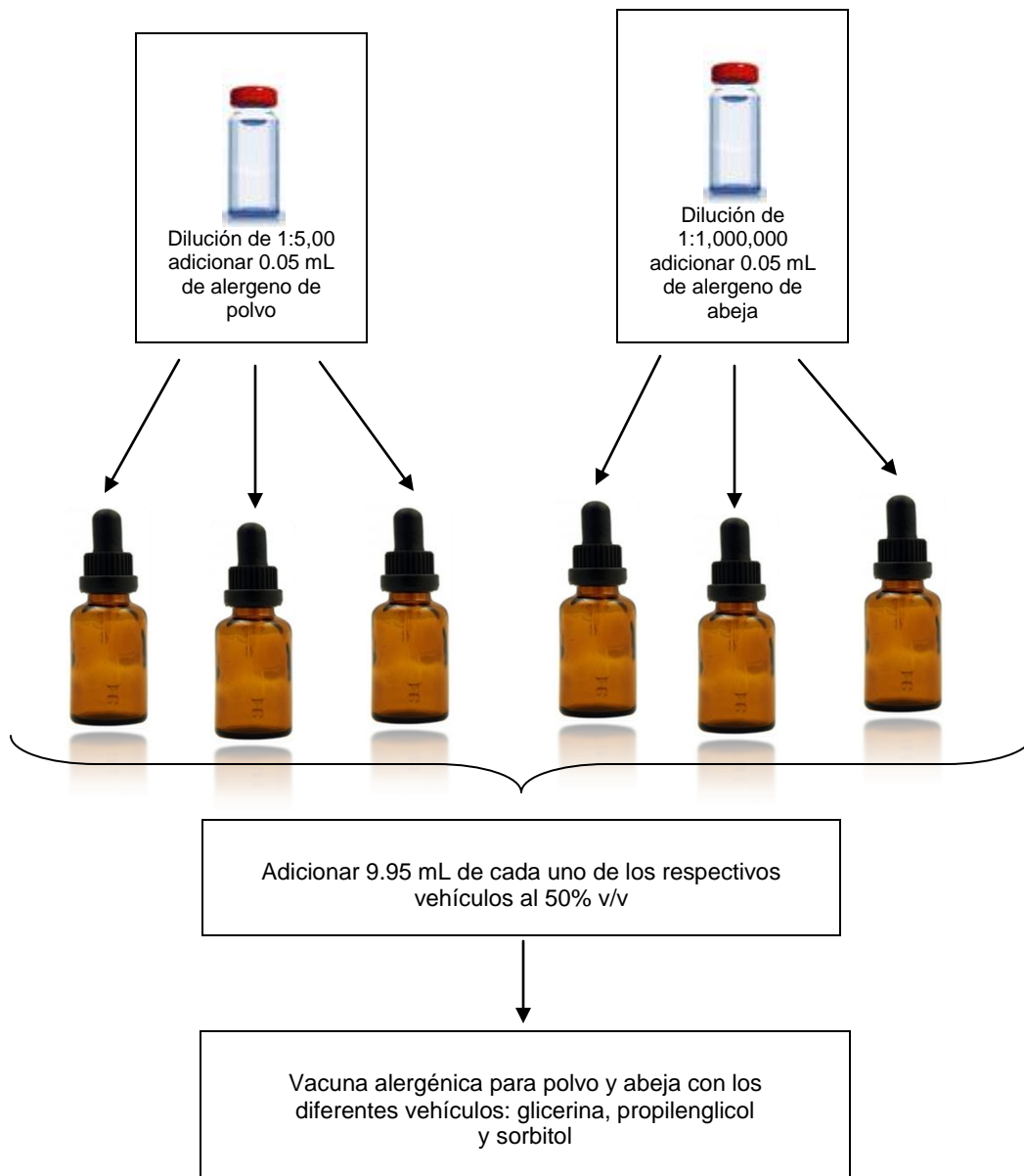


Figura N° 26: Preparación de frasco de preparado alergénico frasco N° 1 de abeja y polvo

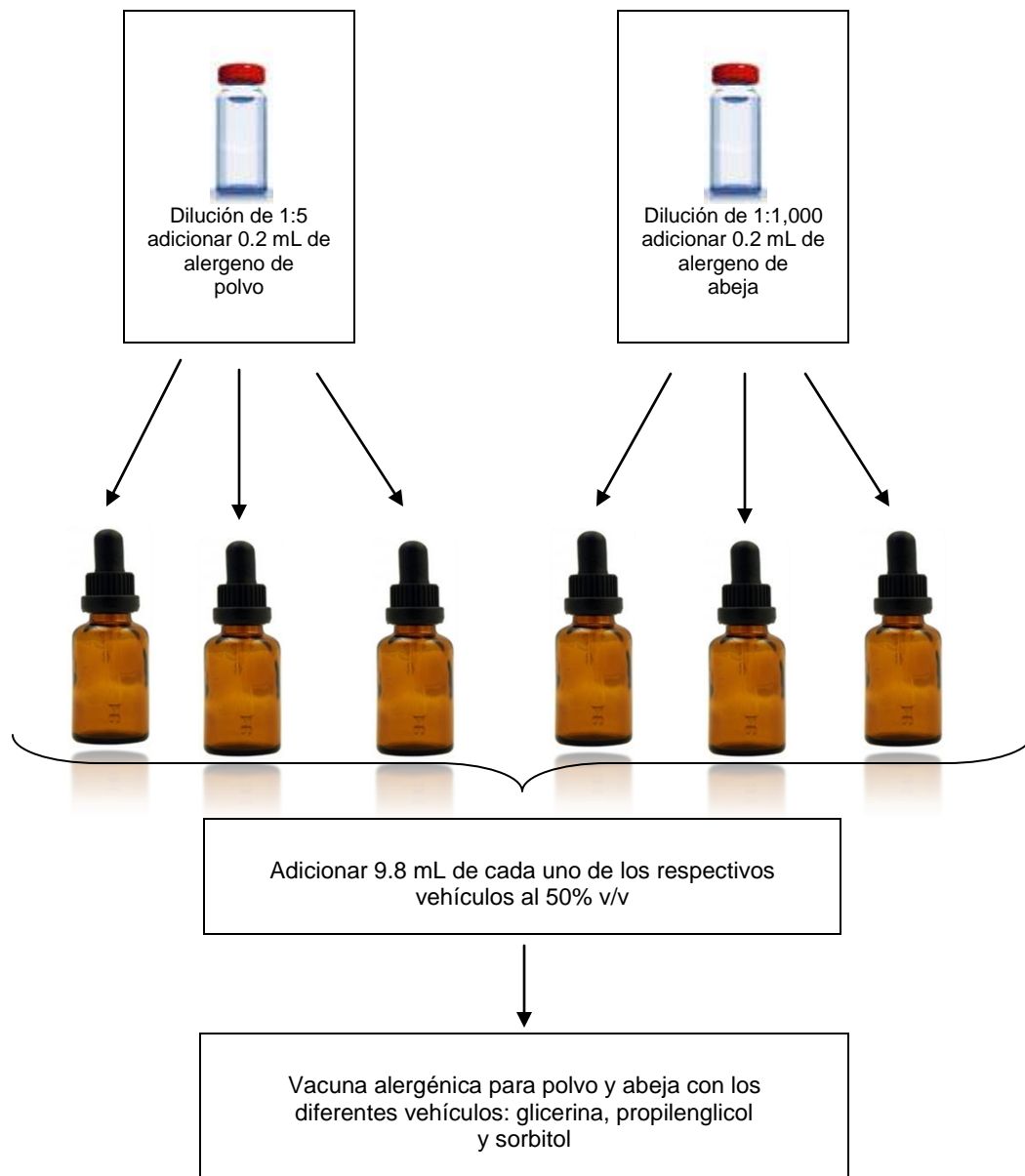


Figura N° 27: Preparación de frasco de preparado alergénico frasco N° 14 de abeja y polvo

ANEXO Nº 6
CALCULO DE CONCENTRACION
TEORICA DE LOS PREPARADOS
ALERGENICOS FRASCOS Nº 1 Y Nº 14

Alérgeno de Abeja (1:10).

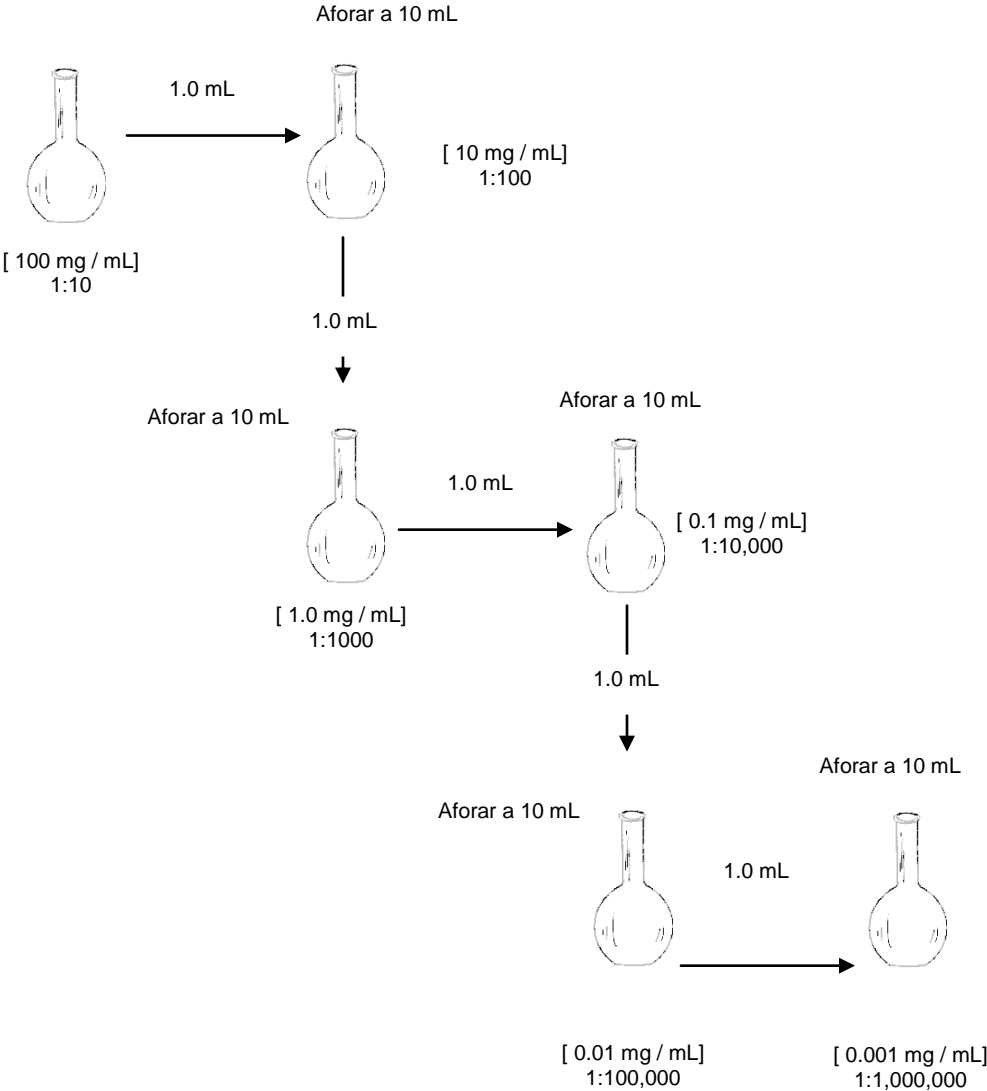


Figura N° 28: Esquema de diluciones para alérgeno de abeja.

ALERGENO DE ABEJA.

Partiendo de la fórmula de la ley de Beer:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$C_2 = \frac{C_1 V_1}{V_2}$$

Frasco N° 1.

Partiendo de la dilución 1:1,000,000

$$C_1 = 0.001 \text{ mg / mL}$$

$$V_1 = 0.05 \text{ mL}$$

$$V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = \frac{(0.001 \text{ mg / mL}) (0.05 \text{ mL})}{10 \text{ mL}}$$

$$C_2 = 0.000005 \text{ mg / mL}$$

$$C_2 = 5 \times 10^{-6} \text{ mg / mL}$$

Frasco N° 14.

Partiendo de la dilución 1:1,000

$$C_1 = 1.0 \text{ mg / mL}$$

$$V_1 = 0.2 \text{ mL}$$

$$V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = \frac{(1.0 \text{ mg / mL}) (0.2 \text{ mL})}{10 \text{ mL}}$$

$$C_2 = 0.002 \text{ mg / mL}$$

ALERGENO DE POLVO

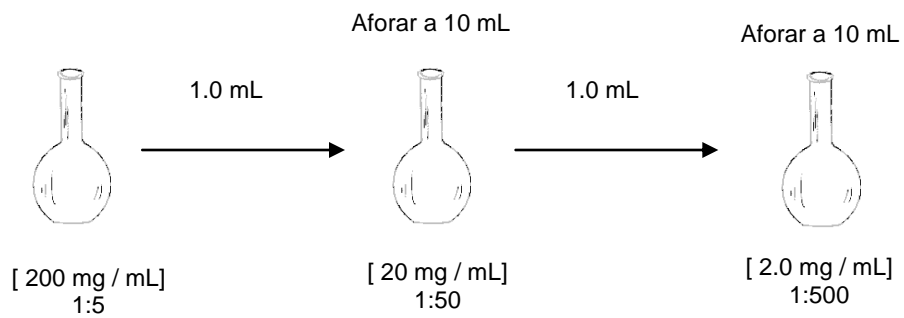


Figura N° 29: Esquema de diluciones para alérgeno de polvo.

Frasco N° 1.

Partiendo de la dilución 1:500

$$C_1 = 2.0 \text{ mg / mL}$$

$$V_1 = 0.05 \text{ mL}$$

$$V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = \frac{(2.0 \text{ mg / mL}) (0.05 \text{ mL})}{10 \text{ mL}}$$

$$C_2 = 0.01 \text{ mg / mL}$$

Frasco N° 14.

Partiendo de la dilución 1:5

$$C_1 = 200 \text{ mg / mL}$$

$$V_1 = 0.2 \text{ mL}$$

$$V_2 = 10 \text{ mL}$$

$$C_2 = \frac{(200 \text{ mg / mL}) (0.2 \text{ mL})}{10 \text{ mL}}$$

$$C_2 = 4.0 \text{ mg / mL}$$

ANEXO Nº 7

**CALCULO DE CONCENTRACION PRÁCTICA DE LOS PREPARADOS
ALERGENICOS**

CALCULOS DE CONCENTRACIONES REALES DE LOS PREPARADOS ALERGENICOS.

Partiendo de la fórmula de regresión lineal:

$$y = mx + b.$$

Donde

b: intercepto de la curva que tiende a cero.

x: concentración del alérgeno.

m: pendiente de la curva.

y: absorbancias de las muestras leídas en espectrofotómetro de luz a una longitud de onda de 545 nm.

$$y = mx$$

$$y = 0.0478x$$

Ejemplo:

Para frasco N° 1 de abeja en glicerina.

$$X = \frac{y}{0.0478}$$

$$x = \frac{0.0105638}{0.0478}$$

$$X = 0.221 \text{ mg / mL}$$

ANEXO N° 8

MATERIALES, EQUIPO, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS₍₃₎

MATERIALES Y EQUIPO.

Pipetas volumétricas de 1.0 mL

Pipetas morh de 1.0 mL

Pipetas morh de 5. 0 mL

Pipeta volumétrica de 10.0 mL.

Vasos de precipitados de 100 mL

Balones volumétricos de 500 mL.

Balones volumétricos de 1000 mL

Cajas de petri.

Tubos de ensayo de 10 mL.

Tubos de ensayo de 90 mL.

Agitador de vidrio.

Probetas de 500 mL

Probetas de 250 mL

Erlenmeyer de 10 mL

Frasco para aforar.

Jeringas de 1.0 mL estériles

Asas de inoculación

Frascos goteros.

Balanza semianalítica.

Autoclave e incubadora.

LIMITES MICROBIANOS ⁽³⁾

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Preparación de Reactivos:

Solución amortiguadora de fosfato de pH 7.2.

Solución Madre:

Reactivos:

- Fosfato monobásico de potasio 34.0 g.
- Hidróxido de sodio SR 175.0 mL
- Agua destilada estéril para hacer un volumen de:1000.0 mL

Procedimiento:

- a) Pesar 34 g de fosfato monobásico de potasio.
- b) Disolver el fosfato monobásico de potasio en aproximadamente 500 mL de agua.
- c) Transferir a un balón volumétrico de 1000 mL.
- d) Ajustar a un pH de 7.2 ± 0.1 agregando hidróxido de sodio SR (aproximadamente 175 mL).
- e) Agregar agua a volumen y mezclar
- f) Verter en recipientes y esterilizar.
- g) Almacenar en refrigeración.
- h) Para su uso, diluir la Solución madre con agua en una proporción de 1 a 800 y esterilizar.

Medios:

Medio Líquido de Digerido de Caseína y Soya (CASOY).

Medio Líquido de Lactosa.

Agar Papa Dextrosa.

Los medios indicados se prepararán según especificaciones del fabricante.

PRUEBAS FISICOQUIMICAS.⁽³⁾**PRUEBA DE BIURET.****PREPARACION DE REACTIVOS**

- Albúmina humana 20.0 g
- Solución de cloruro de sodio (9:1000) 1000.0 mL
- Sulfato cúprico 3.46 g
- Citrato de sodio di hidratado 34.6 g
- Carbonato de sodio 20.0 g
- Agua destilada 200.0 mL

Reactivo de Biuret.

Solución 1.

- Pesar aproximadamente 3.46 g de sulfato cúprico.
- Colocar en un vaso de precipitados de 25 mL y disolver en 10 mL de agua caliente.

- Dejar enfriar.

Solución 2.

- Pesar aproximadamente 34.6 g de citrato de sodio dihidrato y 20 g de carbonato de sodio.
- Colocar en un vaso de precipitados de 200 mL y disolver con 80 mL de agua caliente,
- Dejar enfriar.

Mezclar la solución 1 y 2 en un balón volumétrico de 200 mL y diluirlo con agua, homogenizar la mezcla.

Guardar y almacenar en frascos de vidrio color ámbar.