FARMACOPEA ARGENTINA

OCTAVA EDICIÓN

Farmacopea Argentina

VOLUMEN
I

FARMACOPEA ARGENTINA

OCTAVA EDICIÓN

Ministerio de Salud de la Nación

Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos

ANMAT
Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica

INAME
Instituto Nacional de Medicamentos

FARMACOPEA ARGENTINA

OCTAVA EDICIÓN

Presidente de la Nación
Dra. Cristina Fernández de Kirchner

Jefe de Gabinete de Ministros
Dr. Anibal Fernández

Ministro de Salud de la Nación
Dr. Juan Luís Manzur

Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos
Dr. Gabriel Eduardo Yedlin

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
Dr. Carlos A. Chiale

Instituto Nacional de Medicamentos
Lic. Marta Elsa Spinetto

FARMACOPEA ARGENTINA

OCTAVA EDICIÓN

VOLUMEN
I

COMISIÓN PERMANENTE

FARMACOPEA ARGENTINA

Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina

PRESIDENTE: Dr. Carlos A. Chiale

DIRECTOR EJECUTIVO: Bioq. y Farm. Héctor Giuliani

SECRETARÍA TÉCNICA:

Farm. Melina I. Assalone

Farm. Melina A. Dal Mas

Farm. María Celeste De Angelis

VOCALES:

Dr. Sem M. Albónico

Dr. Arnaldo Luis Bandoni

Dr. Pablo Bazerque

Dr. Mario A. Copello

Dr. Juan M. Dellacha

Dr. Teodoro S. Kaufman

Dr. Eloy Mandrile

Dr. Rubén Manzo

Dra. María Teresa Pizzorno

Dr. Edgardo Poskus

Dr. Modesto Rubio

Dr. Norberto A. Terragno

Dra. María Guillermina Volonté

FARMACOPEA ARGENTINA
OCTAVA EDICIÓN

ÍNDICE POR VOLÚMENES

Primer Volumen

- Prólogo
- Presentación
- Objetivos
- Subcomisiones Técnicas, composición
- Consideraciones Generales
- Métodos Generales de Análisis
- Textos de Información General

Segundo Volumen

- Subcomisiones Técnicas, composición
- Monografías de Materias Primas

Tercer Volumen

- Subcomisiones Técnicas, composición
- Monografías de Productos Terminados
- Apartado de Fitoterápicos
- Apartado de Hemoderivados
- Apartado de Medicamentos Oficinales
- Apartado de Productos Biológicos
- Apartado de Productos Médicos
- Apartado de Productos Radiofarmacéuticos
- Apartado de Sueros y Vacunas

Cuarto Volumen

- Subcomisiones Técnicas, composición
- Reactivos y Soluciones
  - Especificaciones de Reactivos
  - Indicadores, papeles y papeles indicadores
  - Soluciones
    - Reguladoras
    - Colorimétricas
    - Indicadoras
    - de Reactivos
    - Límites
- Tablas
- Índice alfabético

PRÓLOGO

La Farmacopea Argentina o "Codex Medicamentarius Argentino" es el código oficial donde se describen las drogas, medicamentos y productos médicos necesarios o útiles para el ejercicio de la medicina y la farmacia, especificando lo concerniente al origen, preparación , identificación, pureza, valoración y demás condiciones que aseguran la uniformidad y calidad de las propiedades de los mismos.

La farmacopea no es estática sino que mantiene un continuo estado de actualización convirtiéndose en un tratado que construye calidad de la mano con los adelantos tecnológicos en constante revisión.

Lejos quedaron los tiempos de los primeros intentos para la reglamentación y control de drogas y medicamentos en nuestro país; se remontan al 9 de abril de 1822. En esta fecha el Gobernador Martín Rodríguez y su Ministro de Gobierno, Bernardino Rivadavia, mediante un decreto, reglamentaron el ejercicio de la Medicina y la Farmacia, estableciendo que "...la elaboración de las medicinas en las boticas será en todo arreglada a la Farmacopea Española cuarta edición ". La influencia de la cultura francesa en la formación médico farmacéutica de aquella época, hizo que se adoptara posteriormente la Farmacopea Francesa.

Desde su fundación en 1856, la Asociación Farmacéutica Bonaerense, entidad origen de la actual Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica, trabajó afanosamente para elaborar una Farmacopea Nacional, llegando a proponer a las autoridades dos proyectos, el de Miguel Puiggari en 1881 y el de Estanislao Zubieta, publicado en 1880 con el nombre: Formulario Original y Magistral o Farmacopea Argentina. Aunque no llegaron a oficializarse en el año, estos antecedentes sirvieron para apresurar la decisión del Poder Ejecutivo Nacional de satisfacer esa sentida necesidad.

Muchos nombres de notables investigadores, científicos y docentes, han quedado ligados a la elaboración de las sucesivas ediciones demostrando que un calificado recurso humano sería el sostenedor a través del tiempo del proyecto Farmacopea

Así comenzó la historia que se convirtió en una palpable realidad y hoy se traduce en una Comisión Permanente y 21 subcomisiones técnicas integradas por aproximadamente 300 profesionales quienes son los artífices del actual proyecto que ubica a la Argentina entre los países que concientemente saben y proclaman que la Farmacopea establece estándares de calidad para los medicamentos contribuyendo de esta manera a velar por la salud de la población.

Presidente
Farmacopea Argentina

PRESENTACIÓN

En el año 2003 se publicó un primer volumen con el propósito de completar anual e ininterrumpidamente con otros tres volúmenes la Séptima Edición. Si bien se cumplió con el objetivo, debido al tiempo transcurrido, a la actualización de los equipos técnicos de la Autoridad Sanitaria, habiéndose incorporado la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica al Sistema de Inspecciones PIC/S (Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme), siendo Autoridad Reguladora Nacional de Medicamentos de Referencia de la Organización Panamericana de la Salud y teniendo en cuenta los avances científicos y tecnológicos, hemos creído conveniente presentar a ésta como una nueva Edición.

Esta Octava Edición que, por lo tanto incluye las actualizaciones del volumen publicado de la Séptima Edición y los volúmenes: segundo, tercero y cuarto, son el resultado del trabajo de actualización y revisión constante realizado por los profesionales que componen la Comisión Permanente y las subcomisiones asesoras, convocados específicamente con la finalidad de dotar a nuestro país de un material de referencia acorde con los más modernos requisitos en la materia.

Esta Edición en su conjunto, es el fruto de una rigurosa evaluación de las temáticas presentes en distintas farmacopeas, monografías, métodos analíticos, disposiciones reglamentarias, trabajos científicos y experiencias personales del grupo de expertos.

Gracias a la reflexión, el debate y el diálogo permanente con las subcomisiones técnicas, la Comisión Permanente ha establecido los criterios y metodologías que aseguran la calidad de los medicamentos, entendiendo que el aseguramiento de su calidad es un pilar básico y prioritario para mejorar la salud de la población. En esta tarea se ha sentido acompañada por un sinnúmero de interlocutores y ha disfrutado del estímulo generado por los propios deseos de lograr un producto acorde con la responsabilidad que comparte.

Es por ello que confiamos en que la continuidad del diálogo sea la base más sólida para lograr la excelencia de este emprendimiento que constituye uno de sus mayores compromisos con la sociedad.

Director Ejecutivo
Farmacopea Argentina

FARMACOPEA ARGENTINA
OBJETIVOS

La finalidad principal de la Farmacopea Argentina es contribuir a promover la salud de la población, estableciendo parámetros de calidad para los productos empleados en la elaboración de medicamentos. Las normas y especificaciones contenidas en esta publicación constituyen un elemento de consulta indispensable para la Autoridad Sanitaria, para los elaboradores, para los profesionales de la salud, investigadores y docentes, todos ellos involucrados en el aseguramiento de la calidad de los medicamentos para su empleo seguro por parte del paciente.

Sin embargo, construir la calidad de los medicamentos ya sea determinando las especificaciones y los controles de calidad que deben cumplirse, así como los límites de impurezas y los productos de degradación, etc., es una esforzada tarea que sólo pueda llevarse adelante en virtud del trabajo mancomunado de distintos sectores nucleados por una perspectiva sanitaria compartida. Farmacéuticos, Químicos, Bioquímicos, Ingenieros y Médicos, contribuyen con su idoneidad en forma permanente para asegurar esas premisas.

Secretaría Técnica
Farmacopea Argentina

COMPOSICIÓN DE LAS SUBCOMISIONES TÉCNICAS DE LA FARMACOPEA ARGENTINA

Aguas y Soluciones Parenterales
Coordinador: **Farm. Silvetti, Alfredo.**
Farm. Achilli, Estela; Ing. Bichman, Mario; Farm. Colombari, Daniel; Bioq. Chiesa, Carlos; Dr. Dal Bo, Héctor; Ing. D' Ambrosio, Cristina; Lic. Duda, Guillermo; Dr. Fiore, Esteban; Farm. Goin, José Alberto; Ing. Gomez Copello; Farm. Menéndez Viviana; Farm. Mochetto, Rodolfo; Farm. Neder, Jorge; Dra. Nista, Liliana; Lic. Petracca, Antonia; Farm. Ploder, Peter; Farm. Puebla, Ignacio; Farm. Stampone, Patricia; Farm. Szyszkowsky, Juiz Rubén; Lic. Vedoya, Gabriela Silvia.

Biodisponibilidad, Bioequivalencia y Equivalencia Farmacéutica
Coordinador: **Dr. Pesce, Guido.**
Dra. Bignone, Inés; Dr. Bolaños, Ricardo; Dr. Bramuglia, Guillermo; Dr. De Leone, Héctor; Farm. Giarcovich, Silvia; Dra. Niselman, Ada Viviana; Farm. Rey, Andrea; Dr. Seoane, Martín; Farm. Steeman, Gabriela; Bioq. y Farm. Viñas, María Alicia.

Biotecnología
Coordinador: **Dra. Dabsys, Susana.**
Dr. Cascone; Dr. Corley, Esteban; Dr. Criscuolo, Marcelo; Lic. García Franco, Susana; Dra. Giampaolo, Beatriz; Farm. Goyogana, Francisco; Dr. Iglesias, Sergio; Lic. Mammarella, Carlos; Lic. Ostroswski, Héctor; Bioq. Pardo, Verónica; Farm. Pesce, Graciela; Lic. Praturlon, María L.;Dr. Seigelchifer, Mauricio.

Colorantes, Excipientes y Aditivos
Coordinador: **Lic. Ciura, Juan M. Emilio.**
Dra. Brunet, Noemí; Bioq. Bustos, Mónica; Dr. Corseti, Héctor; Dra. Dabbene, Viviana; Dr. Dobrecky, José; Dr. Ferrari, Jorge; Dr. Jacobi, Carlos; Dra. Rivas, Viviana; Dr. Rubio García, Rodolfo; Lic. Taschetti, Mabel; Farm. Trokán, Francisco; Lic. Vallese, María Cristina.

Controles Toxicológicos
Coordinador: **Dr. Roses**, **Otmaro E.**
Dr. Araldi, Héctor; Bioq. Bindstein, Edith; Dra. Bulgach, Delia; Dra. Fulginiti, Ana Susana; Dra. Gruñeiro, Elena; Dra. López, Clara; Dra. Pazos, Liliana; Dr. Pico, José Carlos; Dra. Salseduc, Marta.

Ensayos Farmacotécnicos I
Coordinador: **Dr. Meneghini, Alejandro; Farm. Suarez, Marcelo.**
Lic. Bava, Adriana; Dra. Calandri, Daniela; Farm. Castaña Eduardo; Dr. Chiaramonte, Eduardo; Dra. Simionato, Laura; Dra. Vidal, Noelia.

Ensayos Farmacotécnicos II
Coordinador: **Dr. Allemandi, Daniel; Dra. Olivera, M. Eugenia.**
Dr. Ciccioli, Enrique; Farm. Fasanella, Marta; Farm. Giornelli, Gabriela; Dra. Lavaselli, Susana; Farm. Lloret, M. Antonia; Bioq. Luna, Julio; Lic. Martinez, Juan L.; Dr. Nacucchio, Marcelo; Dr. Porta, Raúl.

Ensayos Farmacotécnicos III
Coordinador: **Farm. Montes de Oca, Federico; Farm. Zubata, Patricia.**
Dra. Bruno, Claudia; Farm. Roberto, Mónica; Farm. Sakson, Mario; Dra. Sanpedro, Pura; Dra. Sedeño, Cristina; Dra. Szeliga, María; Lic. Vega, Julio César.

Estabilidad y Envases
Coordinador: **Lic. Spinetto, Marta.**
Ing. Ariosti, Alejandro; Dra. Blanco, Mirta; Dra. Briñon, Margarita; Lic. Gorisknik, Adriana; Farm. Gruc, Olga Alejandra; Farm. Mandrile, Alejandra; Dra. Nudelman, Norma; Dra. Ortiz, Cristina; Farm. Pilatti, Carina; Ing. Riera, Mónica; Lic. Sánchez, Eduardo; Farm. Tamasi, Diego.

Farmacia Hospitalaria
Coordinador: **Dra. Elías, Mónica; Farm y Bioq. Fernandez, María Cristina.**
Bioq. Bernal Castro, Federico; Dra. Bernavei, Alicia; Farm. Buontempo, Fabian; Bioq. Drunday, Fabian; Lic. Fernández, Farm. Fillinger, Ester, María Laura; Farm. García, Angélica; Farm. Hermida, Miguel; Farm. Iglesias, Fabiana; Dr. Lagomarsino, Eduardo; Farm. y Bioq. Mato, Gabriel; Lic. Melero, Marcia; Farm. Menéndez, Ana María; Dr. Montemerlo, Hugo; Dra. Pita Martin de Portela, María Luz; Farm. Raviolo,

Rodolfo; Farm. Rodríguez, Luis A.; Dra. Slobodianik de Gurevich, Haydeé; Dra. Soifer, Graciela.

Farmacia Oficinal

Coordinadores: **Farm. Ruggieri, José; Farm. Mendez, Raquel.**

Farm. Alvárez, Jorgelina; Farm. Andiñach, Guido; Farm. Callegari, Fernando; Farm. Ferrero, Horacio; Farm. Fitanovich, Nora; Farm. Fridman, Gerardo; Farm. Garcia, Roberto; Farm. Gatica, Karina; Farm. Gomez, Juan; Farm. Gonzalez, Ana María; Farm. Julián, Silvia; Farm. Kleinlein, Patricia; Farm. López de Souza, María del Carmen; Farm. Lopez, Guillermo; Farm. Maino, Héctor; Farm. Mollardo, María Teresa; Farm. Moreno, Patricia; Farm. Nadal, Ana María; Farm. Paura, Andrea; Farm. Perez González, Rocio; Farm. Policelli, Gabriela; Farm. Quijano, Rubén Darío; Farm. Quiroga, Eduardo; Farm. Rencoret, María Mercedes; Farm. Salas, Vivian; Farm. Tokumoto, Fernanda; Farm. Torres, Hugo; Farm. Uema, Sonia; Farm. Valverde, Javier.

Gases Medicinales

Coordinador: **Dr. Marceca, Ernesto.**

Farm. Arcos, Marcelo; Farm. Bernaus, Carlos; Farm. Fischer, Alfredo; Farm. Tourville, Antonio; Dra. Zavala, Estela.

Medicamentos Fitoterápicos

Coordinador: **Dra. Ferraro, Graciela.**

Dra. Agnese, Alicia; Dr. Amat, Aníbal; Dr. Cabrera, José Luis; Dra. Debenedetti, Silvia; Dra. Flores, María Luján; Dra. Gattuso, Martha; Dra. Gattuso, Susana; Dr. Gurni, Alberto; Dra. Lopez, Paula; Dra. Nadinic, Elena; Farm. Padula, Laura Z.; Dra. Rizzo, Inés; Dr. Rondina, Rubén; Lic. Schvarzberg, Nora; Dr. Skliar, Mario; Dra. Spegazzini, Etile; Dr. Wagner, Marcelo; Lic. Zeichen, Rita.

Microbiología

*Coordinador***: Lic. Horacio Frade; Dr. D'Aquino, Miguel.**

Dra. Albesa de Eraso, Inés; Farm. Arakaki, Regina; Farm. Balanian, Silvia Gladys; Dra. Belixán, Norma; Farm. Calvete, Javier; Lic. Cerra, Hector; Dra. Franco, Mirta; Dr. Gutkin, Gabriel; Lic. Lagomarsino, Monica; Dra. Torno, Graciela; Farm. Raffo Palma, Martha; Farm. Salazar, Germán; Dr. Sordelli, Daniel; Bioq. Teves, Sergio; Farm. Vivas, Ariel.

Productos Biológicos

Coordinador: **Bioq. Albertengo, María Elisa.**

Bioq. Esnaola, María Margarita; Bioq. Fraga, Griselda; Farm. Francinelli, Luisa; Dra. Gorzalczany, Susana; Bioq. Mondelo, Nélida; Farm. Nisenbaum, Isaac.

Área de Sangre y hemoderivados. *Coordinador*: **Bioq. Rossi, Marina.**

Dra. Barravecchia de Dehó, Martha; Dra. Caminos, Andrea; Bioq. y Farm. Drucaroff, María Alejandra; Lic. Oliva, Liliana; Dra. Sobrero, Cecilia; Dr. Zarzur, Jorge.

Área de Sueros y vacunas. *Coordinador*: **Dra. Perez, Analia.**

Dra. Brero, María Luisa; Bioq. y Farm. Copello, Cecilia; Dr. Dokmetjian, José; Dr. García, Salvador; Dra. Manghi, Marcela; Farm. Pombo, María Luz; Dra. Rodríguez, María Eugenia, Dr. Yantorno, Osvaldo.

Productos Médicos

Coordinadores: **Dra. Sager de Agostini, Helga.**

Farm. Carbone, Nora; Farm. y Bioq. Benitez, Sergio; Farm. Costanzo, Ricardo; Farm. Gonzalez, María Celeste; Farm. Graña, Nora; Farm. Iervasi, Liliana; Farm. Metz, Rita; Farm. Mosconi, Andrea; Farm. y Bioq. Olivera de O' Connell, Lucía; Farm. Peralta, Laura; Ing. Saba, Fernando; Dra. Staravijosky, Alejandra.

Química Analítica de Medicamentos 1

Coordinador: **Lic. Larrinaga, Alicia.**

Lic. Abelaira, Sara; Lic. Avancini Noceti, Constanza; Lic. Chiarelli, Silvia; Lic. Diez, María Ester; Dra. Dominguez, Silvia; Farm. González, Soledad; Farm. Lynch, Josefina; Lic. Ponce, Claudia; Lic. Pozzo, María del Carmen; Dr. Rivas, Raúl; Dra. Safierowicz, Rosa; Farm. Varela López, Ramón; Farm. Vessuri, María.

Química Analítica de Medicamentos 2

Coordinador: **Dra. Carducci, Clyde.**

Dra. Castellano, Patricia; Lic. Centrone, Claudio; Farm. Faroppa, María; Farm. Fernández Otero, Germán; Dra. Hoyos de Rossi, María; Dra. Longhi, Marcela; Dra. Lucangioli, Silvia; Dra. Palacios de Ortiz, Sara; Bioq. Robles, Juan.

Química Analítica de Medicamentos 3

Coordinador: **Lic. Ercolano, Irma.**

Dra. Alassia de Torres, Liliana; Dr. Blanc, José; Farm. Cereijo, María Inés; Farm. y Bioq. Ceresole, Rita; Dra. Circón de Vidal, Noemí; Farm. Fariña, Mirta; Farm. Gabor, Juliana; Dr. Laba, Raul; Farm. Menéndez, Viviana; Dra. Segall, Adriana; Dra. Serrao, Rosa; Lic. Zinni, Elvira.

Química Analítica de Medicamentos 4

Coordinador: **Dra. Pinet, Ana María.**

Dra. Barros, Carmen; Lic. Luque, Graciela; Dr. Marinaro, Bautista; Farm. Palacios, Marcelo Luis; Dra. Piñeyro, Luisa; Dr. Quatrocchi, Oscar; Farm. Rosasco, María Ana; Farm. Rodríguez, Eduardo; Dr. Sprandeo, Norma; Dr. Sproviero, Jorge; Dra. Stagnaro, Stella Maris.

Radiofármacos
Coordinador: **Dr. Caro, Ricardo y Bioq. Aprea, Patricia.**
Farm. Aletti, Sabrina; Dra. Bergoc, Rosa; Dr. Boccio, José; Dr. Cañelas, Carlos; Bioq. Samson, José Cembal; Dr. Duran, Adrián; Dra. Fraga de Suarez, Amanda; Lic. Furnari, Juan Carlos; Farm. Nicolini, Jorge; Dra. Rutty, Gisela; Farm. Zubillaga, Marcela.

Secretaría Técnica
Farm. Assalone, Melina Isabel; Farm. Dal Mas, Melina Andrea; Farm. De Angelis, María Celeste**.**

Revisores Técnicos
Farm. Compagnucci, María Eugenia; Gear, Jorgelina; Bioq. Martinez, Andrea Verónica; Martinez, Valeria Soledad.

Agradecimientos
Dra. Silvia Boni, Farm. Patricia Zubata, Dra. Silvia Lavaselli, Farm. Soledad Risso Patrón y Sra. Giovanna Sibay Nughes por su colaboración en el capítulo *1050. Formas Farmacéuticas*.
Farm. Mónica Cordera y Farm. Isabel E. Rivadulla por su colaboración en el capítulo *1015. Buenas prácticas de almacenamiento, distribución y transporte*.
Lic. Ana María Chan y María José Arrechea por su colaboración en el capítulo *345. Ensayo de Salmonella/fracción microsomal (Test de Ames) para detección de mutagenicidad.*
A los Laboratorios que colaboraron en la presente Edición.

FARMACOPEA ARGENTINA
OCTAVA EDICIÓN

PRIMER VOLUMEN

ÍNDICE GENERAL

Consideraciones Generales

Métodos Generales de Análisis

<10> - Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos

<20> - Análisis térmico

<30> - Capacidad neutralizante de ácido

<40> - Carbono orgánico total

<50> - Colorantes de uso farmacéutico

<60> - Combustión en erlenmeyer con oxígeno

<70> - Conductividad

<75> - Conductividad en agua calidad farmacéutica

<80> - Conservantes

<90> - Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles

<100> - Cromatografía

<110> - Determinación de aflatoxinas

<120> - Determinación de agua

<130> - Determinación de alcohol

<140> - Determinación de aluminio

<150> - Determinación de cinc

<160> - Determinación de la densidad relativa

<170> - Determinación de la rotación óptica

<180> - Determinación de la temperatura de solidificación

<190> - Determinación de la viscosidad

<200> - Determinación de nitrógeno

<210> - Determinación del contenido extraíble del envase

<220> - Determinación del contenido neto del envase

<225> - Determinación del índice de peróxidos

<230> - Determinación del índice de refracción

<240> - Determinación del intervalo de destilación

<250> - Determinación del pH

<260> - Determinación del punto de fusión

<270> - Determinación del residuo de ignición

<280> - Disolución completa

<290> - Distribución del tamaño de partícula en polvos

<300> - Electroforesis

<310> - Ensayo de disgregación

<320> - Ensayo de disolución

<330> - Ensayo de endotoxinas bacterianas

<335> - Ensayo de micobacterias

<336> - Ensayo de micoplasmas

<339> - Ensayo de neurovirulencia para vacunas a virus vivo

<340> - Ensayo de piretógenos

<345> - Ensayo de *Salmonella*/fracción microsomal (Test de Ames) para detección de mutagenicidad

<350> - Ensayo de sustancias fácilmente carbonizables

<360> - Ensayo de toxicidad anormal

<370> - Ensayos de esterilidad

<380> - Ensayos de reactividad biológica

<383> - Ensayos de suturas

<385> - Ensayos en hemoderivados

<390> - Ensayos farmacotécnicos para aerosoles

<400> - Ensayos farmacotécnicos para supositorios

<410> - Ensayos generales de identificación

<415> - Ensayo para agentes extraños en vacunas virales

<420> - Envases primarios de plástico

<430> - Envases de vidrio

<435> - Envases para productos médicos estériles

<440> - Espectrofotometría de absorción y emisión atómica

<450> - Espectrofotometría de fluorescencia

<460> - Espectrofotometría infrarroja

<470> - Espectrofotometría ultravioleta y visible

<475> - Esterilización

<480> - Grasas y aceites fijos

<490> - Identificación de bases orgánicas nitrogenadas

<500> - Identificación de tetraciclinas

<510> - Impurezas comunes

<520> - Impurezas orgánicas volátiles

<530> - Liberación de principios activos

<540> - Límite de arsénico

<550> - Límite de calcio, potasio y sodio

<560> - Límite de cloruro y sulfato

<570> - Límite de dimetilanilina

<580> - Límite de hierro

<590> - Límite de metales pesados

<600> - Límite de plomo

<610> - Límite de selenio

<620> - Materiales volumétricos

<625> - Métodos de análisis para Gases Medicinales

<630> - Métodos de farmacognosia

<635> - Métodos inmunoquímicos

<640> - Osmolalidad y Osmolaridad

<650> - Partículas en inyectables

<660> - Partículas metálicas en ungüentos oftálmicos

<670> - Pérdida por calcinación

<680> - Pérdida por secado

<690> - Pesas y balanzas

<700> - Polarografía

<710> - Sales de bases orgánicas nitrogenadas

<720> - Termómetros

<730> - Titulación con nitrito

<740> - Uniformidad de unidades de dosificación

<745> - Vacunas de uso humano

<750> - Valoración de esteroides

<760> - Valoración iodométrica de antibióticos beta-lactámicos

<770> - Valoración microbiológica de antibióticos

<780> - Volumetría

Textos de Información General

<1005> - Agua Calidad Farmacéutica

<1013> - Buenas prácticas de dispensación en la farmacia oficinal comunitaria y hospitalaria

<1015> - Buenas prácticas de almacenamiento, distribución y transporte

<1020> - Buenas prácticas de fabricación para elaboradores, importadores/ exportadores de medicamentos

<1025> - Buenas prácticas para la manipulación de medicamentos citostáticos endovenosos en centros asistenciales

<1027> - Buenas prácticas de preparación de medicamentos magistrales

<1030> - Criaderos de pollos libres de patógenos especificados para la producción y control de calidad de las vacunas

<1035> - Equivalencia entre medicamentos

<1040> - Estudios de estabilidad

<1050> - Formas farmacéuticas

<1055> - Formulaciones farmacéuticas para cuidados paleativos

<1060> - Friabilidad y dureza de comprimidos

<1070> - Impurezas en productos oficiales

<1090> - Limpieza de materiales de vidrio

<1095> - Polimorfismo

<1110> - Preparaciones radiofarmacéuticas

<1120> - Productos biotecnológicos

<1125> - Sustratos celulares para la producción de vacunas de uso humano

<1130> - Validación de métodos analítico

CONSIDERACIONES GENERALES

CONSIDERACIONES GENERALES

La Farmacopea es el texto oficial que codifica los principios activos, excipientes y productos farmacéuticos y contiene las especificaciones que éstos deben cumplir para demostrar su calidad y resguardar la salud de la población.

Generalidades

La Farmacopea Argentina en su Octava Edición, a diferencia de las anteriores, está compuesta por cuatro volúmenes. El título de la obra puede abreviarse como *FA 8* y reemplaza a las ediciones anteriores. Cuando se emplea la sigla *FA*, sin ningún otro agregado, la misma se refiere a la *FA 8* durante el tiempo que esta Farmacopea permanezca en vigencia. Estas consideraciones generales se aplicarán a las monografías, capítulos generales u otros textos incluidos en esta Farmacopea.

La expresión "*Oficial*" significa "*de la Farmacopea Argentina*" y se refiere a cualquier título, sustancia, preparación o ensayo incluido en las monografías y capítulos.

Las iniciales *FA*, acompañando al nombre oficial en el rótulo de un producto, indica que el mismo cumple con las especificaciones de la Farmacopea Argentina, aunque esto no constituye una certificación por parte de la misma.

El uso del título de una monografía supone que la sustancia, preparación o producto así designado se ajusta a las especificaciones de la monografía correspondiente. Tales referencias en los textos de la Farmacopea se indican mediante el título de la monografía en letra cursiva.

Tanto las monografías como los capítulos generales pueden contener excepciones a estas Consideraciones Generales, las mismas serán señaladas explícitamente, al igual que el procedimiento a seguir en cada caso. Para destacar la existencia de excepciones, se agregará la expresión: "*A menos que se especifique de otro modo*". Asimismo, en caso de ausencia de una excepción explícita, las expresiones deberán interpretarse como se indica en este documento.

Los ensayos y valoraciones descriptos son los métodos oficiales sobre los cuales se fundamentan las especificaciones de la Farmacopea.

Para evitar repetir instrucciones comunes a un ensayo determinado, en las monografías, se establecen los requisitos en forma abreviada, indicando el nombre del capítulo correspondiente con un número de orden asignado entre los símbolos <y>, como por ej. *<100>*. *Cromatografía*, que luego es apropiadamente desarrollado en la sección *Métodos Generales de Análisis*.

Todas las declaraciones contenidas en las monografías, con las excepciones dadas más adelante, constituyen normas para las sustancias oficiales. Una sustancia es de calidad Farmacopea Argentina cuando cumple con todos los requisitos establecidos en la monografía respectiva.

Los ensayos elegidos se han ideado para detectar o determinar las impurezas más significativas y para fijar el contenido límite de aquellas.

Manteniendo el criterio sustentado por la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, se reconocerán vigentes, a los efectos legales, monografías, capítulos generales, reactivos, etc., suprimidos en la presente edición e inscriptos en ediciones anteriores, siempre que no hayan sido modificados e incluidos en esta edición. En el caso de textos incluidos en alguna edición anterior de la Farmacopea, pero no en la presente, que tuvieran errores tipográficos o de otra característica o pasibles de corrección o modificación por su importancia, la Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, está autorizada a hacer las enmiendas necesarias, toda vez que sean advertidos o requeridos.

Definiciones

Medicamento: toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra.

Principio activo o droga farmacéutica: toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana.

Especialidad medicinal o farmacéutica: todo medicamento, designado por un nombre convencional, sea o no una marca de fábrica o comercial, o por el nombre genérico que corresponda a su composición y contenido, preparado y envasado uniformemente para su distribución y expendio, de composición cuantitativa definida declarada y verificable, de forma farmacéutica estable y acción terapéutica comprobable.

Nombre genérico: denominación de un principio activo o droga farmacéutica o, cuando corresponda, de una asociación o combinación de principios activos a dosis fijas, adoptada por la Autoridad Sanitaria Nacional o, en su defecto, la denominación común internacional de un principio activo recomendada por la Organización Mundial de la Salud.

Excipiente: es toda sustancia de origen natural o sintética presente en una preparación farmacéutica incorporada sin propósito terapéutico.

Producto farmacéutico: es un preparado que contiene uno o varios principios activos y excipientes, formulados bajo una determinada forma farmacéutica. Suele emplearse "preparación farmacéutica" como sinónimo de "producto farmacéutico", para referirse tanto al producto a granel como al producto terminado.

Forma Farmacéutica: Es el producto proveniente de la transformación de un principio activo o de una asociación de los mismos mediante procedimientos fármacotécnicos, a fin de conferirles características físicas y morfológicas particulares para su adecuada dosificación y conservación, y que faciliten su administración y acción farmacológica.

Interpretación de los requisitos

Las normas farmacopeicas definen las características de un producto y establecen los ensayos que permiten demostrar que el mismo satisface los requisitos elementales de calidad, exigidos por la Autoridad Sanitaria.

Estas normas se aplican en cualquier momento de la vida útil del producto, desde la elaboración hasta su fecha de vencimiento.

No debe entenderse que el cumplimiento de las especificaciones establecidas en la monografía a muestras de un lote de producción asegure el cumplimiento de las normas farmacopeicas de todos los componentes del lote.

Los datos obtenidos a partir de estudios de validación del proceso de fabricación y de controles efectuados durante el proceso pueden dar mayores garantías del cumplimiento de los requisitos de una monografía en particular, que la información obtenida a partir del examen de un número determinado de unidades de ese lote.

Las tolerancias y límites expresados en las definiciones de las monografías son para compensar las variaciones inevitables durante la preparación del producto y el deterioro normal que se produce durante la vida útil del mismo.

Cuando se expresan límites en forma numérica, los límites superior e inferior de un intervalo incluyen esos dos valores y todos los valores intermedios. Los límites expresados en las definiciones de las monografías y en las especificaciones de los ensayos, independientemente de que éstos estén expresados en porcentajes o valores absolutos, son valores significativos hasta el último dígito.

En los procedimientos volumétricos, se establece el peso de la sustancia analizada que equivale a cada mililitro del valorante estandarizado. En estos casos, se entiende que el número de cifras significativas en la concentración del valorante corresponde al número de cifras significativas en el peso de la sustancia analizada. Se deberán hacer las correcciones con respecto al blanco para todas las valoraciones volumétricas según corresponda (ver *780. Volumetría*).

Cuando el resultado deba calcularse con referencia a la *sustancia seca*, se hará uso de las condiciones de secado que se indiquen en el ensayo *Pérdida por secado* en la monografía. Cuando el resultado se calcule con referencia a la *sustancia anhidra*, el contenido de agua será determinado por el método descripto en la monografía bajo el subtítulo *Agua*.

Actualizaciones

Se considera una *actualización total* cuando todo el texto reemplaza al de la edición anterior; por ej., *<590>. Límite de metales pesados*, identificándose con un asterisco en el índice alfabético (*) y, en el título del texto actualizado, se encontrará la leyenda "*Actualización total"*. Se considera una *actualización parcial* cuando sólo una parte del texto ha sido modificada, identificándose con un asterisco en el índice alfabético (*) y, en el título del texto actualizado, se encontrará la leyenda "*Actualización parcial"*. En este último caso se encontrará subrayado el fragmento del texto que ha sido actualizado.

Armonizaciones

El PWG (Pharmacopoeial Working Group) es uno de los Grupos de Trabajo de la Red Panamericana de Armonización de Reglamentación Farmacéutica, conformado por la Farmacopea Argentina -*FA* -, Farmacopea Brasileña –*FB*-, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos -*FEUM*- y Farmacopea de los Estados Unidos -*USP*-.

El plan de trabajo del PWG fortalece el intercambio científico tecnológico entre las farmacopeas, facilita el intercambio de información, de expertos y fomenta las actividades conjuntas que contribuyan a mejorar la calidad de los productos farmacéuticos en la región de las Américas. El objetivo de la armonización es lograr la obtención

de normas idénticas para todas las características de un producto y su meta a largo plazo es elaborar una Farmacopea de las Américas.

Los textos armonizados por este grupo de trabajo se señalarán con el símbolo <*PWG*> como subíndice; por ej., *Determinación del residuo de ignición* $_{<PWG>}$.

El PDG (Pharmacopeial Discussion Group) es el Grupo de Discusión de las Farmacopeas constituido por la Farmacopea Europea -*EP*-, la Farmacopea de los Estados Unidos -*USP*- y la Farmacopea Japonesa -*JP*-. Persigue el mismo objetivo que el PWG y trabaja en coordinación con las actividades de la Conferencia Internacional sobre Armonización, de sus siglas en inglés ICH.

La Farmacopea Argentina adhiere a las armonizaciones de este grupo de trabajo tomando como oficial los textos que de estas deriven pudiendo incluir atributos que le son propios a la región.

Los textos armonizados a este grupo de trabajo se señalarán con el símbolo <*PDG*> como subíndice; por ej., *Almidón de Maíz* $_{<PDG>}$.

Expresión de concentraciones

Los porcentajes de concentración se expresan de la siguiente manera:

Porcentaje peso en peso (% p/p): expresa el número de gramos de un soluto en 100 g de solución o mezcla.

Porcentaje peso en volumen (% p/v): expresa el número de gramos de un soluto en 100 ml de solución, y se utiliza prescindiendo de que el diluyente en cuestión sea agua u otro líquido.

Porcentaje volumen en volumen (% v/v): expresa el número de mililitros de un soluto en 100 ml de solución.

La expresión *porcentaje* empleada sin otro calificativo significa: porcentaje peso en peso para mezclas de sólidos y semisólidos, porcentaje peso en volumen para soluciones o suspensiones de sólidos en líquidos, porcentaje volumen en volumen para soluciones de líquidos en líquidos y porcentaje peso en volumen para soluciones de gases en líquidos.

Sustancias de Referencia

Sustancia de Referencia Farmacopea Argentina [SR-FA] - Material de uniformidad comprobada, cuya monografía ha sido incluida en la *Farmacopea Argentina*, desarrollado a través de ensayos colaborativos avalados por esta Farmacopea y A.N.M.A.T – I.NA.ME, cuyo empleo se reserva a ensayos químicos y físicos específicos en los que se comparan sus propiedades con las de un producto problema y que posee un grado de pureza adecuado para el uso al que se destina.

Cuando una *Sustancia de Referencia Farmacopea Argentina* no esté disponible, deberá emplearse aquélla equivalente reconocida por esta Farmacopea.

Sustancias auxiliares

Se denomina *Sustancia auxiliar* a cualquier sustancia incorporada a las preparaciones oficiales, tales como colorantes, conservantes saborizantes. La misma deberá ser inocua o agregada en una proporción que garantice la inocuidad, no tener influencia adversa sobre la seguridad y eficacia terapéutica de los principios activos y no interferir en los ensayos y valoraciones.

Sustancia oficial es aquella que no contiene sustancias auxiliares agregadas salvo que se permita específicamente en la monografía correspondiente. En este caso, el rótulo deberá indicar los nombres y las cantidades de las sustancias auxiliares agregadas.

Colorantes: son sustancias auxiliares incorporadas a las preparaciones oficiales exclusivamente para dar color. Deberán satisfacer las especificaciones establecidas (ver *50. Colorantes de uso farmacéutico*).

Conservantes: son sustancias auxiliares que se agregan a las preparaciones oficiales para protegerlas de la contaminación microbiana. La expresión "*conservante antimicrobiano apropiado*" implica que puede agregarse al preparado una sustancia auxiliar, siempre que cumplan con las especificaciones establecidas (ver *80. Conservantes*).

Reactivos

La realización correcta de ensayos y valoraciones de esta Farmacopea, así como la obtención de resultados reproducibles y confiables, depende de la calidad de los reactivos empleados.

Todos los reactivos requeridos para los ensayos y valoraciones se definen en *Reactivos y Soluciones.*

Abreviaturas

La sigla *SR-FA* corresponde a *Sustancia de referencia de la FA*.

Las siglas (*SC*) y (*SR*) corresponden a *Solución Colorimétrica* y *Solución de Reactivo*, respectivamente indicadas en *Reactivos y Soluciones.*

La sigla (*SV*) corresponde a *Solución Volumétrica* e indica que tal solución está estandarizada de acuerdo con las instrucciones

dadas en la monografía respectiva o bajo el título *Soluciones volumétricas* en *Reactivos y Soluciones.*

La sigla *(SL)* corresponde a *Solución Límite* e indica que dicha solución es empleada para ensayos límite.

Agua

La expresión agua, empleada sin otra calificación significa *Agua purificada* y agua libre de dióxido de carbono, es *Agua purificada* que ha sido calentada a eb ullición durante al menos 5 minutos y enfriada en forma tal de evitar la absorción de dióxido de carbono atmosférico.

Agua purificada estéril - Es el *Agua purificada* esterilizada. Se emplea en la preparación de formas farmacéuticas líquidas no parenterales en las que se requiera una forma estéril de *Agua purificada*.

Agua para inyectables - La fuente de agua es agua potable, previamente purificada y sometida a destilación u ósmosis reversa de doble paso. Debe cumplir con todos los requisitos de *Agua purificada* y además con los requisitos del ensayo de endotoxinas bacterianas (ver *330. Ensayo de endotoxinas bacterianas*).

Agua estéril para inyectables - Es *Agua para inyectables* esterilizada. Se emplea principalmente como solvente de productos parenterales.

Agua bacteriostática para inyectables - Es *Agua estéril para inyectables* a la cual se le ha agregado uno o varios conservantes apropiados. Se utiliza como solvente de preparados parenterales. Puede envasarse en envases monodosis o multidosis de un tamaño no mayor a 30 ml.

Agua estéril para irrigación - Es *Agua para inyectables* esterilizada en envases monodosis de más de 1 litro destinados a una rápida descarga del contenido. No necesita cumplir con el ensayo *650. Partículas en inyectables.*

Agua estéril para inhalación - Es *Agua para inyectables* envasada en envases monodosis no mayores a 20 ml y esterilizada. Se emplea en nebulizadores y en la preparación de soluciones para nebulizar.

Solución fisiológica

Cuando en las monografías o capítulos generales se indique *Solución fisiológica* emplear una solución de cloruro de sodio al 0,9 % en agua purificada.

Solución fisiológica estéril - Es una solución de cloruro de sodio al 0,9 % en agua para inyectables que cumple con los requisitos de *370. Ensayo de Esterilidad*.

Solución fisiológica para nebulizar - Es una solución de cloruro de sodio al 0,90 % en agua purificada preparada sin el agregado de conservantes, conservada en envases monodosis de hasta 20 ml, con ausencia de gérmenes revivificables en un mililitro y en cuyo rótulo se indica: "*Solución fisiológica para nebulizar. No inyectable*".

MONOGRAFÍAS

Fórmula Química

Cuando se conoce la composición química de una sustancia oficial, se especifica a título informativo la fórmula molecular y desarrollada, el peso molecular y el número CAS (Chemical Abstracts Service). Esta información se refiere a la sustancia químicamente pura y no se considera un indicador de la pureza del material oficial.

Cuando se especifica la configuración estereoquímica absoluta, se emplean los sistemas de designación propuestos por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) *R*/*S* y *E*/*Z*.

Caracteres Generales

Las afirmaciones comprendidas bajo el subtítulo *Caracteres generales* referidas a t érminos como inodoro, prácticamente inodoro, con un débil olor característico o expresiones semejantes, se aplican al examen después de la exposición al aire durante 15 minutos de un envase recientemente abierto del producto (envases que contengan no más de 25 g) o de una porción de aproximadamente 25 g del producto (en caso de envases más grandes) que haya sido trasladada de su envase a un cristalizador, con una capacidad de aproximadamente 100 ml.

Solubilidad

El término parcialmente soluble se emplea en el caso de una mezcla en la que sólo una parte de sus componentes se disuelve. El término miscible se emplea para describir un líquido que es miscible en todas las proporciones con el solvente indicado.

Las indicaciones de solubilidad que figuran bajo el epígrafe *Caracteres generales* se expresan en términos cuyo significado, referido a u na temperatura entre 15 y 30 °C, es el siguiente:

Término descriptivo	*Volúmenes aproximados de solvente en mililitros por gramo de sustancia*
Muy soluble	Inferior a 1

Fácilmente soluble	De 1 a 10
Soluble	De 10 a 30
Moderadamente soluble	De 30 a 100
Poco soluble	De 100 a 1.000
Muy poco soluble	De 1.000 a 10.000
Prácticamente insoluble	Más de 10.000

Identificación

Los ensayos de la Farmacopea que figuran después del subtítulo *Identificación* no están destinados a proporcionar una confirmación completa de la estructura química o composición del producto; su objeto es confirmar que el producto se ajusta a la descripción dada en el rótulo del envase. Cuando un producto no satisface los requisitos de un ensayo de identificación descripto, indica que el mismo no cumple con las especificaciones. Otros ensayos o especificaciones en la monografía a menudo contribuyen a establecer o confirmar la identidad del producto ensayado.

Ensayos y valoraciones

Los ensayos y las valoraciones descriptas en esta Farmacopea constituyen los métodos oficiales de análisis. El analista podrá emplear ensayos alternativos, previamente validados, si demuestran otorgar ventajas desde el punto de vista de la exactitud, precisión, sensibilidad, selectividad o simplifican el procedimiento sin modificar los atributos anteriores. Sin embargo, en caso de indecisión o litigio, los ensayos descriptos en esta Farmacopea serán los definitivos.

La concentración de impurezas establecida en ciertos ensayos se expresa entre paréntesis como porcentaje o partes por millón (ppm). En el caso que corresponda, el cumplimiento de este ensayo será necesario para establecer la conformidad de un producto.

Los materiales volumétricos, pesas y balanzas deberán ajustarse a las especificaciones establecidas en los capítulos *<620>. Materiales volumétricos* y *<690>. Pesas y balanzas.*

Cuando en un ensayo o valoración se indique que se debe examinar una cierta cantidad de sustancia o un número exacto de unidades de dosificación, la cantidad especificada representa un número mínimo que se elige únicamente para facilitar la manipulación analítica. Esto de ninguna manera limita la cantidad total de material a emplear.

Procedimientos

En todos los ensayos descriptos en esta Farmacopea, se deberá cumplir estrictamente con las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

La utilización de las siguientes expresiones, empleadas en ensayos descriptos en la *FA* se refieren a:

Blanco: cuando se indique que se deben hacer las correcciones necesarias por medio de una determinación con un control, tal determinación se hará empleando las mismas cantidades de los reactivos tratados de igual manera que la solución o mezcla que contiene la sustancia bajo valoración o ensayo, pero omitiendo dicha sustancia.

Baño de agua: cuando se indique el empleo de *baño de agua*, se empleará un baño de agua a ebullición salvo que se indique una temperatura distinta.

Baño de vapor: cuando se indique el empleo de *baño de vapor,* podrá emplearse la exposición al vapor vivo fluente u otra forma de calor regulado, a una temperatura equivalente a la del vapor fluente.

Cepas microbianas: cuando se cita una *cepa microbiana* y se la identifica por el número de catálogo ATCC (American Type Culture Collection) o de otra colección similar, la cepa específica se empleará directamente o, si se subcultiva, se emplearán no más de cinco pasajes a partir de la cepa original.

Comparación de color: cuando se indique una *comparación visual de color o de turbidez*, deberán emplearse tubos de comparación de fondo plano (tubos de Nessler) cuyas medidas internas se correspondan lo más estrechamente posible. Para la comparación del color, los tubos en posición vertical deberán ser observados longitudinalmente a lo largo del tubo con una fuente de luz difusa sobre un fondo blanco, mientras que para la comparación de turbidez deberán ser observados transversalmente, colocados sobre un fondo oscuro, con ayuda de una fuente luminosa que los ilumine lateralmente.

Cuantitativamente y en etapas: cuando se indique que una solución debe ser diluida cuantitativamente y en etapas, una porción medida con exactitud será disuelta en agua u otro solvente en la proporción indicada en uno o más pasos. La elección del material volumétrico a emplearse deberá tener en cuenta los errores relativamente grandes que generalmente se asocian a materiales volumétricos de volumen pequeño (ver *620. Materiales volumétricos*).

Densidad relativa: cuando no se indique lo contrario, la densidad relativa se calculará como la relación entre el peso de un volumen determinado de una sustancia en el aire a 25 °C y el peso de un volumen igual de agua a esa misma temperatura.

Desecador: la expresión *en un de secador* especifica el empleo de un recipiente perfectamente cerrado, de tamaño y forma apropiados, que mantenga una atmósfera de bajo contenido de humedad mediante gel de sílice u otro desecante apropiado.

Filtrar: cuando se indique filtrar, sin otra calificación, se entenderá que el líquido debe ser filtrado a través de papel de filtro apropiado o con un medio equivalente de modo que el filtrado sea claro.

Ignición hasta peso constante: significa que deberá continuarse la ignición a 800 ± 25 °C a menos que se indique de otro modo, hasta que dos pesadas consecutivas no difieran en más de 0,50 mg por gramo de sustancia ensayada, haciendo la segunda pesada después de un período de 15 minutos de ignición adicional.

Indicador: cuando una solución de reactivo se utilice como indicador, se agregarán aproximadamente 0,2 ml o 3 gotas de la solución, generalmente cerca del punto final, a menos que se indique de otro modo.

Medidas de presión: el término *mm Hg* empleado en referencia a mediciones de presión se refiere al uso de un manómetro apropiado o un barómetro calibrado en términos de la presión ejercida por una columna de mercurio de la altura indicada.

Pesar y medir exactamente: las expresiones *pesar exactamente alrededor de* o *medir exactamente alrededor de* indican que se debe tomar una cantidad dentro de 100 ± 10 % del peso o volumen especificado. Sin embargo, el peso o volumen que se tome deberá ser determinado con exactitud y el resultado calculado sobre la base de la cantidad que se haya tomado. Se pueden tomar cantidades proporcionalmente mayores o menores que los pesos y volúmenes especificados, tanto para la *Sustancia de referencia* como para la sustancia en ensayo, siempre que la medida se tome con exactitud y que se ajusten a los pasos siguientes, para proporcionar concentraciones equivalentes a las descriptas. Expresiones tales como *25,0 ml* y *25,0 mg* se emplean en relación a medidas de volumen o de peso e indican que la cantidad debe ser *medida o pesada exactamente* dentro de los límites establecidos en los capítulos *<620>. Materiales volumétricos* o *<690>. Pesas y balanzas.*

Pipetas: cuando se indique el uso de una pipeta para medir un volumen, aquélla deberá cumplir con los requisitos establecidos en el capítulo *<620>. Materiales volumétricos* y deberá emplearse de manera que el error no exceda el límite establecido para una pipeta del tamaño especificado. Cuando se especifica el empleo de una pipeta, ésta puede sustituirse por una bureta apropiada que cumpla con los requisitos especificados en *<620>. Materiales volumétricos.*

Secado hasta peso constante: significa que deberá continuarse el secado a menos que se indique de otro modo, hasta que dos pesadas consecutivas no difieran en más de 0,50 mg por gramo de sustancia ensayada, haciendo la segunda pesada después de una hora adicional de secado; según la metodología establecida en la monografía correspondiente.

Soluciones: la expresión *1 en 10* significa que 1 parte en volumen de un líquido debe diluirse con, o 1 parte *en peso* de un sólido debe disolverse en suficiente solvente para que el volumen de la solución final sea de 10 partes en *volumen.*

La expresión *10:6:1* significa que los números respectivos de partes, en volumen, de los líquidos señalados deberán mezclarse, a menos que se indique de otro modo.

La expresión partes por millón (ppm) sin otra precisión, se refiere a peso con respecto a un millón de partes en peso.

Solventes: cuando no se menciona explícitamente el solvente, se entiende que la muestra es disuelta en agua.

Temperaturas: todas las temperaturas en esta Farmacopea se expresan en grados centígrados (Celsius) y todas las mediciones se hacen a 25 °C, a menos que se especifique de otro modo.

Tiempo límite: al efectuar ensayos y valoraciones se aguardará 5 minutos para que se produzca la reacción, a menos que se especifique de otro modo.

Vacío: el término *al vacío* especifica la exposición a una presión menor de 20 mm Hg, a menos que se indique de otro modo. Cuando se especifique en la monografía correspondiente la desecación al vacío sobre un desecante, se deberá emplear un desecador al vacío, una pistola para desecar al vacío u otro instrumento apropiado para este fin.

MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS

Cada capítulo general es designado por un número de orden seguido del nombre del mismo entre paréntesis, como por ej. (ver *100.*

Cromatografía). Estos capítulos que incluyen los requerimientos generales para ensayos y valoraciones son numerados de 1 a 990 y los capítulos que forman los textos de información general son numerados a partir de 1000.

ATRIBUTOS ADICIONALES

Además de cumplir los requisitos de los ensayos de Sustancias relacionadas, Pureza cromatográfica y Límite de impurezas, descriptos en las monografías correspondientes, el análisis de las materias primas deberá complementarse mediante la búsqueda de impurezas de síntesis y sustancias relacionadas según el origen de las mismas.

UNIDADES DE POTENCIA BIOLÓGICA

Para las sustancias que no puedan ser caracterizadas completamente por medios químicos o físicos, podrá ser necesario expresar la actividad en unidades de potencia biológica.

Las unidades de potencia biológica definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de Estándares Biológicos Internacionales y Preparaciones Biológicas de Referencia Internacionales son denominadas Unidades Internacionales (UI). Las unidades definidas en la *FA* son Unidades Internacionales y las monografías correspondientes se refieren a éstas.

Para los antibióticos cuya potencia se expresa en unidades, éstas son definidas por las correspondientes *Sustancias de referencia SR-FA*. Cada unidad es en general establecida, basada en la definición de la Unidad Internacional de la OMS. Sin embargo, para la mayoría de los antibióticos no son necesarias las unidades biológicas de potencia y su actividad se expresa en unidades métricas (microgramos o miligramos) en función de sustancias químicamente definidas descriptas en las monografías correspondientes.

ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

La elaboración de productos farmacéuticos deberá realizarse observando los principios de *<1020>. Buenas prácticas de fabricación para elaboradores, importadores/exportadores de medicamentos* y el producto resultante deberá cumplir con los requisitos técnicos establecidos en esta Farmacopea.

ENVASES

Los requisitos farmacopeicos para el empleo de envases se especifican en las monografías correspondientes.

El empleo de las siguientes expresiones descriptas en esta Farmacopea se refieren a:

Envase con cierre inviolable: es aquél provisto de un dispositivo especial que revela inequívocamente si ha sido abierto.

Envase inactínico: es aquél que protege el contenido de los efectos de la luz, gracias a las propiedades específicas de los materiales con que está compuesto.

Envase bien cerrado: es el que evita el ingreso de sólidos extraños y la pérdida del contenido bajo las condiciones usuales de manejo, almacenamiento, distribución y transporte.

Envase de cierre perfecto: es aquél que protege el contenido de la contaminación con sustancias extrañas y evita la entrada de humedad, impidiendo la efervescencia, delicuescencia o evaporación bajo las condiciones usuales de manejo, almacenamiento, transporte, manteniendo su condición de cierre perfecto después de su manipulación.

Envase hermético: es aquel que no permite la entrada de sólidos, líquidos o gases en las condiciones usuales de manejo, almacenamiento, distribución y transporte.

Envase seguro para niños: es aquel que posee un mecanismo tal que dificulta su apertura directa. Dichos envases sólo pueden ser abiertos luego de recibir las instrucciones pertinentes.

Envase monodosis: es aquel que está diseñado para contener una cantidad de sustancia destinada a administrarse en una única dosis, inmediatamente después de abierto.

Envase multidosis: es aquel que permite la extracción de porciones sucesivas del contenido sin cambios en la potencia, calidad o pureza de la porción remanente.

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

El almacenamiento de productos debe ser realizado en condiciones adecuadas de temperatura, humedad e iluminación de acuerdo con las instrucciones del fabricante, de manera de no afectar adversamente de forma directa o indirecta, la calidad de los mismos. Este concepto debe extenderse a la distribución y transporte.

Las sustancias y las preparaciones descriptas en la *FA* deberán almacenarse a temperatura ambiente, a menos que se especifique de otro modo.

El empleo de las siguientes expresiones descriptas en esta Farmacopea se refieren a:

Almacenar en un freezer: corresponde al almacenamiento del producto a u na temperatura establecida entre - 25 y – 10 °C.

Almacenar en un sitio frío: corresponde al almacenamiento del producto a una temperatura que no exceda los 8 °C. Una *heladera/refrigerador* es un sitio frío con una temperatura que se mantiene termostáticamente entre 2 y 8 °C.

Almacenar en un sitio fresco: corresponde al almacenamiento del producto a temperatura entre 8 y 15 °C. Las cámaras frías permiten obtener estas condiciones.

Almacenar a t emperatura ambiente: corresponde al almacenamiento a temperatura entre 15 y 30 °C. E ste concepto esta relacionado al almacenamiento en depósitos de laboratorios de especialidades medicinales y distribuidoras.

Almacenar a temperatura ambiente controlada: corresponde al almacenamiento de un producto a temperatura termostáticamente controlada entre 20 y 25 °C.

En algunas monografías pueden indicarse las siguientes expresiones:

"Evitar almacenar en ambientes cálidos" definiendo *cálido* a temperatura entre 30 y 40 °C.

"Evitar el calor excesivo", definiendo *calor excesivo* a temperatura superior a 40 °C.

"Evitar el congelamiento" en los casos en que el mismo ocasionara la pérdida de potencia o cambio en las características fisicoquímicas de un producto.

Indicaciones generales:

- No deben retirarse los medicamentos de sus envases primario y secundario.
- No deben exponerse los productos al sol ni a las temperaturas extremas.
- Se debe evitar almacenar los medicamentos en ambientes húmedos.
- No deben almacenarse medicamentos en heladera excepto que dicha condición se encuentre indicada en el rótulo, prospecto y/o envase.

ROTULADO

El rótulo de cada producto deberá establecer el contenido del o de los principios activos expresados en las monografías.

Cantidad de principio activo por unidad de dosificación: la potencia de un producto se expresa en el rótulo del envase como microgramos, miligramos, gramos, porcentaje del ingrediente, o unidad internacional terapéuticamente activa presente en la preparación.

Las formas farmacéuticas como cápsulas, comprimidos u otras formas de dosificación establecidas en esta Farmacopea deberán rotularse de modo que expresen la cantidad de cada principio activo contenido en cada unidad de dosificación.

En el caso de líquidos de administración oral o sólidos para reconstituir, deberán rotularse en términos, como por ej., *cada 5 mililitros* del líquido o del preparado resultante.

Rotulado de electrolitos: la concentración y dosificación de electrolitos para terapias de re-posición deberá especificarse en miliequivalentes-gramo (mEq).

Rotulado del contenido alcohólico: el contenido de alcohol en una preparación líquida deberá especificarse como % v/v de etanol.

Fecha de vencimiento: la fecha de vencimiento identifica el fin del período de vida útil del producto, durante el cual el mismo deberá cumplir con los requisitos de esta Farmacopea, siempre que se conserve en las condiciones de almacenamiento establecidas.

Todos los productos deberán exhibir la fecha de vencimiento en el rótulo y en su envase primario, la cual es asignada a través de estudios de estabilidad realizados para esa formulación en un envase predefinido y autorizado por la Autoridad Sanitaria.

UNIDADES DEL SISTEMA INTERNACIONAL (SI) Y EQUIVALENCIA CON OTRAS UNIDADES DE MEDIDA

Los nombres y símbolos empleados en la *Farmacopea Argentina* para las unidades de medición son los del Sistema Internacional de Unidades (SI), establecido por la Conferencia General de Pesas y Medidas. Comprende tres clases de unidades: unidades básicas, unidades derivadas y unidades complementarias.

Cantidad		Unidad		Definición
Nombre	Símbolo	Nombre	Símbolo	
Longitud	*l*	metro	M	El metro es la longitud del camino recorrido por la luz en el vacío durante un intervalo de tiempo igual a 1/299.792.458 de segundo.
Masa	*m*	kilogramo	Kg	El kilogramo es igual a la masa del patrón internacional del kilogramo.
Tiempo	*t*	segundo	S	El segundo es la duración de 9.192.631.770 de la

				radiación correspondiente a l a transición de los dos niveles hiperfinos del estado fundamental del átomo de cesio-133.
Corriente eléctrica	*I*	amperio	A	El amperio es la corriente constante que, mantenida en dos conductores paralelos de longitud infinita, de sección circular despreciable, en el vacío y separados por una distancia de un metro, produciría entre ellos una fuerza igual a 2×10^7 newton por metro de longitud.
Temperatura termodinámica	*T*	kelvin	K	El kelvin es la fracción 1/273,16 de la temperatura termodinámica del punto triple del agua.
Cantidad de sustancia	*n*	mol	Mol	El mol es la cantidad de sustancia de un sistema que contiene tantas unidades elementales como el número de átomos contenidos en 0,012 kilogramos de carbono-12.
Intensidad luminosa	I_v	candela	Cd	La candela es la intensidad luminosa en una dirección determinada de una fuente emisora de radiación monocromática con una frecuencia de 540×10^{12} hertz y cuya intesidad de energía en dicha dirección es de 1/683 watt por estereorradian.

Unidades utilizadas con el SI

Cantidad	Unidad		Valor en unidades SI
	Nombre	Símbolo	
	Minuto	*min*	1 min = 60 s
Tiempo	Hora	*h*	1 h = 60 min = 3.600 s
	Día	*d*	1d = 24 h = 86.400 s
Ángulo plano	Grado	°	$1° = (\pi/180)$ rad
Volumen	Litro	*l*	$1\ l = 1\ dm^3 = 10^{-3}\ m^3$
Masa	Tonelada	*t*	$1\ t = 10^3$ kg
Frecuencia de giro	revolución por minuto	*rpm*	$1\ rpm = (1/60)\ s^{-1}$

Múltiplos y submúltiplos decimales de las unidades

Factor	Prefijo	Símbolo	Factor	Prefijo	Símbolo
10^{18}	exa	*E*	10^{-1}	deci	*d*
10^{15}	peta	*P*	10^{-2}	centi	*c*
10^{12}	tera	*T*	10^{-3}	mili	*m*
10^{9}	giga	*G*	10^{-6}	micro	*μ*
10^{6}	mega	*M*	10^{-9}	nano	*n*
10^{3}	kilo	*k*	10^{-12}	pico	*p*
10^{2}	hecto	*h*	10^{-15}	femto	*f*
10^{1}	deca	*da*	10^{-18}	atto	*a*

Unidades SI utilizadas en la *Farmacopea Argentina* y su equivalencia con otras unidades

Cantidad		Unidad				Conversión de otras unidades en unidades SI
Nombre	Símbolo	Nombre	Símbolo	Expresión en unidades SI básicas	Expresión en otras unidades SI	
Número de onda	ν	uno por metro	1/m	m^{-1}		
Longitud de onda	λ	micrómetro	μm	10^{-6}m		
		nanómetro	Nm	10^{-9}m		

Frecuencia	ν	hertz	Hz	s^{-1}		
Área	*A, S*	metro cuadrado	m^2	m^2		
Volumen	*V*	metro cúbico	m^3	m^3		1 ml = 1 cm^3 = $10^{-6}m^3$
Densidad (concentración de masa)	ρ	kilogramo por metro cúbico	kg/m^3	$kg\ m^{-3}$		1g/ml=1g/cm^3=10^3kg/m^3
Velocidad	*v*	metro por segundo	m/s	$m\ s^{-1}$		
Fuerza	*F*	newton	N	$m\ kg\ s^2$		1 dina=1g cm s^{-2}=10^5N 1 kp = 9,80665 N
Presión	*P*	pascal	Pa	$m^{-1}\ kg\ s^{-2}$	$N\ m^{-2}$	1 dina/cm^2 =10^{-1}Pa=10^{-1} N m^{-2} 1atm = 101.325 Pa = 101,325 kPa 1 bar = 105 kPa = 0,1 Mpa 1 mmHg = 133,322387 Pa 1 Torr = 133,322368 Pa 1 psi = 6,894757 kPa
Viscosidad absoluta	η	pascal segundo	Pa s	$m^{-1}\ kg\ s^{-1}$	$N\ s\ m^{-2}$	1 P = 10^{-1} Pa s = 10^{-1} N s m^2 1 cP = 1 mPa s
Viscosidad cinemática	ν	metro cuadrado por segundo	m^2/s	$m^2\ s^{-1}$	Pa s m^3 kg^{-1} N m s kg^{-1}	1 St = 1 cm^2 s^{-1} = 10^{-4} m^2 s^{-1}
Energía	*W*	joule	J	$m^2\ km\ s^{-2}$	N m	1 erg = 1 cm^3 g s^{-2} = 1 dina cm = 10^{-1} J 1 cal = 4,1868 J
Potencia (flujo de radiación)	*P*	watio	W	$m^2\ km\ s^{-3}$	N m s^{-1} J s^{-1}	1 erg/s = 1 dina cm s^{-1} = 10^{-7} W = 10^{-7} N m s^{-1} = 10^{-7} J s^{-1}
Dosis absorbida (energía radiante)	*D*	gray	Gy	$m^2\ s^{-2}$	J kg^{-1}	1 rad = 10^{-2} Gy
Potencial eléctrico (fuerza electromotriz)	*U*	volt	V	$m^2\ kg\ s^{-3}\ A^{-1}$	W A^{-1}	
Resistencia eléctrica	*R*	ohm	Ω	$m^2\ kg\ s^{-3}\ A^{-2}$	V A^{-1}	
Cantidad de electricidad	*Q*	coulomb	C	A s		
Actividad de un radionuceído	*A*	becquerel	Bq	s^{-1}		1 Ci = 37×10^9 Bq = 37×10^{-9} s^{-1}
Concentración molar	*M*	molaridad	mol/dm^3	$10^3\ mol\ m^{-3}$		1 mol/l = 1 M = 1 mol/dm^3 = 10^3 mol m^{-3}

MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS DE ENSAYOS BIOLÓGICOS

CONTENIDOS

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Diseño general y precisión

2 ALEATORIZACIÓN E INDEPENDENCIA DE LOS TRATAMIENTOS INDIVIDUALES

3 ENSAYOS QUE DEPENDEN DE RESPUESTAS CUANTITATIVAS

3.1 Modelos estadísticos

3.1.1 Principios generales

3.1.2 Ensayos de rutina

3.1.3 Cálculos y restricciones

3.2 Modelo de líneas paralelas

3.2.1 Introducción

3.2.2 Diseño del ensayo

3.2.2.1 Diseño completamente aleatorizado

3.2.2.2 Diseño en bloques aleatorizados

3.2.2.3 Diseño cuadrado latino

3.2.2.4 Diseño cruzado

3.2.3 Análisis de varianza

3.2.4 Criterios de validez

3.2.5 Estimación de la potencia y límites de confianza

3.2.6 Valores perdidos

3.3 Modelo de relación de pendientes

3.3.1 Introducción

3.3.2 Diseño del ensayo

3.3.3 Análisis de varianza.

3.3.3.1 Diseño (hd + 1)

3.3.3.2 Diseño (hd)

3.3.4 Criterios de validez

3.3.5 Estimación de la potencia y límites de confianza

3.3.5.1 Diseño (hd + 1)

3.3.5.2 Diseño (hd)

4 ENSAYOS QUE DEPENDEN DE RESPUESTAS CUANTALES

4.1 Introducción

4.2 Método de probitos

4.2.1 Tabulación de resultados

4.2.2 Criterios de validez

4.2.3 Estimación de la potencia y límites de confianza

4.2.4 Ensayos no válidos

4.3 Método de logitos

4.4 Otras formas de la curva

4.5 Dosis mediana efectiva

5 EJEMPLOS

5.1 Modelo de líneas paralelas

5.1.1 Ensayo múltiple de tres dosis con diseño completamente aleatorizado

5.1.2 Ensayo múltiple de cinco dosis con diseño completamente aleatorizado

5.1.3 Ensayo de dos dosis con diseño de cuadrado latino y sin replicación

5.2 Modelo de relación de pendientes

5.2.1 Ensayo completamente aleatorizado con diseño (1,3,3)

5.2.2 Ensayo completamente aleatorizado con diseño (0,4,4,4)

6 COMBINACIÓN DE RESULTADOS DE ENSAYOS

6.1 Introducción

6.2 Combinación ponderada de resultados de ensayos

6.2.1 Cálculo de los coeficientes de ponderación

6.2.2 Homogeneidad de las estimaciones de potencia

6.2.3 Cálculo de la media ponderada y límites de confianza

6.2.4 Media ponderada y límites de confianza basados en la variación intra e inter ensayo

6.3 Combinación no ponderada de resultados de ensayos

6.4 Ejemplo de potencia media ponderada y límites de confianza de ensayos de líneas paralelas

6.5 Ejemplo de potencia media ponderada y límites de confianza de ensayos de relación de pendientes con igual potencia supuesta

7 TABLA

7.1 Distribución *F*

7.2 Distribución *t*

7.3 Distribución χ^2

7.4 Distribución Φ

8 GLOSARIO DE SIMBOLOS

1 INTRODUCCIÓN

Este capítulo proporciona una guía para el diseño de los ensayos biológicos especificados en la Farmacopea Argentina (FA) y para el análisis de sus resultados. Puede ser empleado por personas cuya especialidad no es la estadística pero tienen la responsabilidad del análisis e interpretación de resultados de estos ensayos a menudo sin la ayuda y consejo de un estadístico. Los métodos de cálculo descriptos en el presente capítulo no son obligatorios para analizar los ensayos biológicos que constituyen en sí mismos una parte obligatoria de la FA. Pueden usarse métodos alternativos siempre que no sean menos confiables que los descriptos en este documento. Existe una gran variedad de programas de computación disponibles y pueden ser útiles dependiendo de la disponibilidad y de la habilidad del analista.

Se debería asegurar el asesoramiento de un experto en estadística cuando: la investigación o desarrollo de nuevos productos requiera un adecuado diseño y un análisis estadístico específico; cuando se requiera analizar amplias curvas dosis-respuesta no lineales, por ejemplo en inmunoensayos; o cuando no se puedan cumplimentar las restricciones impuestas al diseño en este capítulo, por ejemplo igual número de dosis igualmente espaciadas.

1.1 Diseño general y precisión

Se describen métodos biológicos para la valoración de ciertas sustancias y preparaciones cuya potencia no puede determinarse adecuadamente mediante análisis químicos o físicos. El principio aplicado, siempre que sea posible a lo largo de estos ensayos, es el de comparación con una preparación estándar de forma que se determina qué cantidad de la sustancia, que se va a examinar, produce el mismo efecto biológico que una cantidad dada, la *Unidad*, de la preparación estándar. Es una condición esencial de dichos métodos biológicos, que los ensayos sobre la preparación estándar y sobre la sustancia a examinar se realicen al mismo tiempo y bajo condiciones tan idénticas como sea posible. Para algunos ensayos (por ejemplo determinación de título de un virus) la potencia de la muestra no se expresa relativa a un estándar.

Cualquier estimación de potencia obtenida a partir de un ensayo biológico está sometida a un error aleatorio debido a la variabilidad inherente de las respuestas biológicas y los cálculos de errores deben realizarse, si es posible, a partir de los resultados de cada ensayo incluso cuando se usa el método oficial. Por lo tanto a continuación se describen métodos para el diseño de ensayos y el cálculo de sus errores. En cualquier caso antes de adoptar un método estadístico deben realizarse ensayos preliminares, en cantidad suficiente, para descubrir la aplicabilidad de este método. El intervalo de confianza para potencias dadas es una indicación de la precisión con la cual la potencia ha sido estimada en el ensayo. Se calcula teniendo en cuenta el diseño experimental y el tamaño de la muestra. En ensayos biológicos normalmente se escogen límites de confianza del 95 por ciento. Se usan métodos matemáticos para calcular estos límites de forma que se justifique la expectativa de que hay una probabilidad (confianza) del 95 por ciento de que estos límites incluyan la verdadera potencia.

Los límites de confianza de la potencia constituyen un indicador de la precisión con la que se ha calculado la potencia en el ensayo, que esta precisión sea aceptable para la FA depende de los requisitos establecidos en la monografía de la preparación.

Los términos "*media*" y "*desviación estándar*" se usan en este documento según se definen en los libros de texto de estadística actuales.

Los términos "*potencia declarada*", "*potencia asignada*", "*potencia asumida*", "*relación de potencias*" y "*potencia estimada*" se usan en esta sección para indicar los siguientes conceptos:

- *potencia declarada*: en el caso de un producto formulado es un valor nominal asignado a partir del conocimiento de la potencia de la materia prima; en el caso de una materia prima es la potencia estimada por el fabricante.

- *potencia asignada*: es la potencia de una preparación estándar.

- *potencia asumida*: es la potencia de la preparación que se va a examinar y que forma la base del cálculo de las dosis que podrían ser equipotentes con las dosis que se van a usar de la preparación estándar.

- *relación de potencias de una preparación desconocida*: es la relación de dosis equipotentes de la preparación estándar y de la preparación desconocida bajo las condiciones del ensayo.

- *potencia estimada*: es la potencia calculada a partir de los datos del ensayo.

La *Sección 8. Glosario de símbolos* es una tabla de los usos más importantes de símbolos a lo largo de este capítulo. Cuando el texto hace referencia a símbolos no mostrados en esta sección o usa un símbolo para designar un concepto diferente, éste se define en esa parte del texto.

2 ALEATORIZACIÓN E INDEPENDENCIA DE LOS TRATAMIENTOS INDIVIDUALES

La asignación de los distintos tratamientos a diferentes unidades experimentales (animales, tubos, etc.) debe realizarse mediante algunos procesos estrictamente aleatorios. Cualquier otra elección de condiciones experimentales que no haya sido permitida deliberadamente en el diseño experimental también debe hacerse al azar. Son ejemplos la elección de las posiciones de las jaulas en un laboratorio y el orden en el que se administran los tratamientos. En particular, un grupo de animales que recibe la misma dosis de cualquier preparación no debe tratarse conjuntamente (al mismo tiempo o en la misma posición) a menos que haya una fuerte evidencia de que la fuente relevante de variación (por ejemplo, entre tiempos o entre posiciones) es despreciable. Pueden realizarse asignaciones aleatorias a partir de tablas estándar de números aleatorios de muestreo que normalmente van acompañados de instrucciones de uso. Cualquiera que sea el método empleado, el analista debe tener cuidado de usar series diferentes de números aleatorios para los diferentes ensayos.

Las preparaciones asignadas a cada unidad experimental deberían ser tan independientes como sea posible. Dentro de cada grupo experimental, las diluciones realizadas para las dosis asignadas a cada tratamiento no deben ser simplemente divisiones de la misma dosis sino que deben prepararse individualmente. Sin esta precaución indispensable, la variabilidad inherente a la preparación no estará completamente representada en la varianza del error experimental. El resultado será una subestimación del error residual que conduce a:

1) un aumento no justificado en la rigurosidad de las pruebas para el análisis de varianza (ver en la *Sección 3: Análisis de varianza* y *Criterios de validez*).

2) una subestimación de los límites de confianza verdaderos del ensayo, los cuales, como se muestra en la *Sección 3. Estimación de la potencia y límites de confianza*, se calculan a partir de la estimación de s^2 del cuadrado medio del error residual.

3 ENSAYOS QUE DEPENDEN DE RESPUESTAS CUANTITATIVAS

3.1 *Modelos Estadísticos*

3.1.1 Principios generales

Los ensayos biológicos incluidos en la FA se han concebido como “ensayos de dilución”, lo que significa que se supone que la preparación desconocida a ensayar contiene el mismo principio activo que la preparación estándar pero en una proporción diferente de componentes activos e inertes. En tal caso la preparación desconocida puede obtenerse, en teoría, a partir de la preparación estándar por dilución con componentes inertes.

Para comprobar si un ensayo en particular se comporta como un ensayo de dilución es necesario comparar la relación dosis-respuesta de estándar y desconocido. Si la relación difiere significativamente el ensayo es “no válido”. Diferencias significativas en la relación dosis-respuesta de estándar y desconocido puede significar que una de las preparaciones contiene, además del principio activo, otro componente no inerte que puede influenciar la respuesta. Para hacer evidente el efecto de dilución, en el modelo teórico, es útil transformar la relación dosis-respuesta en una función lineal en el rango más amplio de dosis posible.

Para los ensayos biológicos descriptos, son de interés dos modelos estadísticos: el modelo de líneas paralelas y el modelo de relación de pendientes.

La aplicación de uno u otro depende del cumplimiento de las siguientes condiciones:

1) los diferentes tratamientos se han asignado al azar a las unidades experimentales;

2) las respuestas a cada tratamiento se distribuyen normalmente;

3) la desviación estándar de las respuestas dentro de cada grupo de tratamiento, para la preparación estándar y desconocido, no difiere significativamente una de otra.

Cuando un ensayo está en etapa de desarrollo el analista tiene que cerciorarse que los datos recolectados de muchos ensayos satisfacen estas condiciones teóricas.

- La condición 1 puede cumplirse usando eficazmente la *Sección 2*.

- La condición 2 es una condición que casi siempre se cumple en la práctica. Desviaciones pequeñas de esta suposición no introducen diferencias serias en el análisis siempre y cuando se incluyan varias réplicas por tratamientos. Cuando se sospechen desviaciones de la distribución normal en una serie de muestras pequeñas puede usarse la *Prueba de Shapiro -Wilk para normalidad de distribución. Wilk, M.B. y Shapiro*, *S.S.* (1968). The joint assessment of normality of several independent samples, Technometrics 10,825-839.

- La condición 3 puede ser probada con un ensayo para homogeneidad de la varianza (*prueba de Bartlett, prueba de Cochran*) Bartlett, M.S(1937). Properties of sufficiency and statistical tests, Proc. Roy. Soc. London, Series A 160, 280-282. Cochran, W.G (1951). Testing a linear relation among variances, Biometrics 7, 17-32.

Cuando el analista sospecha que no se cumplen las condiciones 2 y/o 3, una transformación de la respuesta "y" a ln y, o a $\sqrt{y}$ o a y^2 puede conducir a un mejor cumplimiento de estas condiciones. Deberán consultarse libros de texto de estadística para otras transformaciones.

- La transformación logarítmica de "y" en ln y puede ser útil cuando la homogeneidad de varianzas no es satisfactoria. También puede mejorar la normalidad si la distribución tiene asimetría a la derecha.
- La transformación de "y" en $\sqrt{y}$ es útil cuando las observaciones siguen una distribución Poisson, es decir cuando se obtienen por conteo.
- La transformación de "y" en y^2 puede ser útil si, por ejemplo, la dosis parece ser más proporcional al área de una zona de inhibición que a la medida del diámetro de esa zona.

El analista debe decidir sobre el tipo de transformación adecuada para cada tipo de ensayo biológico cuando éste se está poniendo a punto en su laboratorio. Cuando las condiciones 2 y/o 3 parecen no cumplirse durante un ensayo rutinario de este tipo, el analista no debe adoptar otra transformación a menos que esté convencido de que este incumplimiento de los requisitos no es casual, sino que es debido a un cambio sistemático de las condiciones experimentales, en este caso debe repetirse el ensayo preliminar antes de adoptar una nueva transformación para los ensayos rutinarios.

Una categoría distinta la forman los ensayos en los que no puede medirse la respuesta en cada una de las unidades experimentales, sino que solamente puede contarse la fracción de unidades que responden a cada tratamiento. Esta categoría se trata en la *Sección 4*.

3.1.2 Ensayos de rutina

Cuando los ensayos se hacen de forma rutinaria, es raro que se cumplan de forma sistemática las condiciones 1 a 3 debido a que el número limitado de observaciones por ensayo probablemente tenga influencia en la sensibilidad del análisis estadístico. Afortunadamente, los estadísticos han demostrado que, en ensayos balanceados simétricamente, las desviaciones pequeñas en la homogeneidad de varianza y en la normalidad no afectan de forma grave los resultados del ensayo. La aplicación de los modelos estadísticos sólo necesita cuestionarse si una serie de ensayos muestran una validez dudosa, entonces puede ser necesario realizar nuevas series de investigaciones preliminares como se discute en la *Sección 3.1.1*.

Otras dos condiciones necesarias dependen del modelo estadístico a usar:

A - Para modelo de líneas paralelas (ver *Figura 3.2.1.-I*)

4A - La relación entre el logaritmo de la dosis y la respuesta puede representarse por una línea recta en el intervalo de dosis usadas.

5A - Para cualquier preparación desconocida en el ensayo, la línea recta es paralela a la del estándar.

B - Para modelo de relación de pendientes (ver *Figura 3.3.1.-I*)

4B - La relación entre la dosis y la respuesta puede representarse por una línea recta, para cada preparación, en el intervalo de dosis usadas.

5B - Para cualquier preparación desconocida en el ensayo la línea recta intersecta, al eje y, a la dosis cero en el mismo punto que la línea recta de la preparación estándar (es decir, la función respuesta, de todas las preparaciones analizadas en el ensayo, tienen que tener el mismo punto de intersección, en el eje y, que la función respuesta del estándar).

Las condiciones 4A y 4B sólo se pueden verificar en los ensayos en los que se hayan analizado al menos tres diluciones de cada preparación. El empleo de un ensayo con menos diluciones puede estar justificado cuando la experiencia haya demostrado que la linealidad y el paralelismo o igual intersección se cumplen regularmente.

Después de recolectar los datos y antes de calcular la potencia relativa de cada preparación se debe realizar un análisis de varianza con la finalidad de comprobar el cumplimiento de las condiciones 4A y 5A o 4B y 5B. Para esto, el total de las sumas de cuadrados se subdivide en cierto número de sumas de cuadrados correspondientes a cada una de las condiciones que se deben cumplir. La suma de cuadrados remanente representa el error experimental residual con la cual la ausencia o existencia de fuente de variación relevante se pueden comparar mediante una serie de valores de razones F.

Cuando se ha establecido la validez, la potencia de cada preparación desconocida con respecto al estándar puede calcularse y expresarse como una relación de potencias o convertirse en alguna unidad relevante en la preparación bajo ensayo, por ejemplo, una unidad internacional. También pueden estimarse los límites de confianza a partir de cada serie de datos del ensayo.

Si no se cumple alguna de las cinco condiciones (1, 2, 3, 4A y 5A o 1, 2, 3, 4B y 5B) los métodos de cálculo descriptos aquí no son válidos y debe realizarse un estudio especial del diseño del ensayo.

El analista no debería adoptar otra transformación a menos que haya evidenciado que el no cumplimiento de los requisitos no es accidental sino debido a un cambio o variación sistemática de las condiciones experimentales. En este caso se debe repetir el ensayo descripto en la *Sección 3.3.1* antes de adoptar una nueva transformación en los ensayos de rutina.

En ensayos de rutina desarrollados para comparar preparaciones similares un número excesivo de ensayos no válidos, debido a ausencia de paralelismo o de linealidad, denota probablemente diseños con replicaciones inadecuadas. Normalmente esta falta de adecuación se debe a un reconocimiento incompleto de todas las fuentes de variabilidad que afectan al ensayo, lo cual puede producir una subestimación del error residual que conduciría a razones *F* grandes.

No siempre es posible tener en cuenta la totalidad de las posibles fuentes de variación dentro de un ensayo simple (por ejemplo, variaciones día a día). En un caso así, los intervalos de confianza de ensayos repetidos sobre la misma muestra pueden no superponerse satisfactoriamente y se debe poner especial cuidado en la interpretación de los intervalos de confianza individuales. Para obtener una estimación más confiable del intervalo de confianza puede ser necesario desarrollar varios ensayos independientes y combinar éstos en una única potencia estimada y un intervalo de confianza (ver *Sección 6*).

Con la finalidad de controlar la calidad de los ensayos de rutina es recomendable guardar copia de los valores estimados de la pendiente de regresión y del valor estimado del error residual en las cartas control.

- Un error residual excepcionalmente alto puede indicar algún problema de tipo técnico. Éste debería ser investigado, y si se puede evidenciar algún error analítico en el ensayo, debería ser repetido. Un error residual inusualmente alto puede indicar la presencia de un valor atípico ocasional o de una observación aberrante. Se rechaza una respuesta que es cuestionable debido a una falla en el cumplimiento del procedimiento durante el desarrollo del ensayo. Si se descubre un valor aberrante después de que las respuestas ya han sido registradas, que puede ser adjudicable a irregularidades del ensayo, su omisión puede estar justificada. La exclusión arbitraria o el mantenimiento de una respuesta aparentemente atípica puede ser una fuente grave de sesgo. En general el rechazo de observaciones solamente porque un ensayo para "valores atípicos" sea significativo, es desaconsejable.
- Un error residual excepcionalmente bajo puede ocurrir alguna vez y ser causa de que los valores de la razón *F* excedan los valores críticos. En tal caso puede estar justificado reemplazar el error residual estimado, a partir del ensayo individual, por un error residual medio obtenido de datos históricos registrados en las cartas control.

3.1.3 *Cálculos y restricciones*

Conforme a los principios generales de buen diseño, se imponen normalmente las tres siguientes restricciones en el diseño del ensayo. Éstas presentan ventajas tanto para facilitar el cómputo como para mejorar la precisión.

a) cada preparación en el ensayo debe ser contrastada con el mismo número de dosis.

b) en el modelo de líneas paralelas, el cociente entre las dosis adyacentes debe ser constante para todos los tratamientos en el ensayo (progresión geométrica); en el modelo de relación de pendientes, el intervalo entre dosis adyacentes debe ser constante para todos los tratamientos en el ensayo (progresión aritmética).

c) debe haber un número igual de unidades experimentales para cada tratamiento.

Si se utiliza un diseño que cumple estas restricciones los cálculos son sencillos. Las fórmulas se encuentran en las *Secciones 3.2* y *3.3*. Se recomienda el uso de aplicaciones informáticas (software) que hayan sido desarrolladas para esta finalidad particular. Existen varios programas que pueden fácilmente manejar todos estos diseños de ensayo descriptos en las monografías correspondientes. No todos los programas emplean las mismas fórmulas y algoritmos, pero deben llevarnos a los mismos resultados.

Los diseños de ensayo que no cumplan las restricciones señaladas arriba pueden ser igualmente posibles y correctos, pero las fórmulas que precisan son demasiado complicadas para ser descriptas en este texto.

Las formulas para los diseños restringidos dadas en el texto pueden ser empleadas por ejemplo para crear programas *ad hoc* en una planilla de cálculos. Se pueden emplear los ejemplos de la *Sección 5* para comprobar si tales programas dan resultados correctos.

3.2 Modelo de líneas paralelas

3.2.1 *Introducción*

En la *Figura 3.2.1.-I* se representa el modelo de líneas paralelas. El logaritmo de las dosis se representa en el eje de abscisas y las respuestas en el eje de ordenadas. Las respuestas individuales a cada tratamiento se señalan con puntos negros. Las dos líneas son las relaciones calculadas ln(dosis)-respuesta para el estándar y para la preparación desconocida.

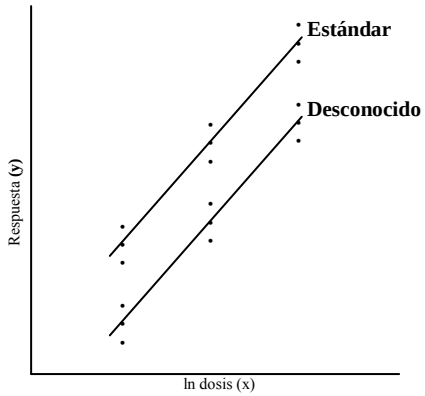


Figura 3.2.1.-I.-Modelo de líneas paralelas para un ensayo 3 + 3.

[NOTA: **a lo largo del texto se utilizará el logaritmo neperiano (ln). Donde aparezca el término "antilogaritmo" significa la e^x**. Sin embargo, los Briggs o logaritmos "comunes" (log o $\log_{10}$) pueden ser igualmente empleados. En este caso el antilogaritmo correspondiente es 10^x].

Para que un ensayo sea satisfactorio la potencia asumida de la preparación desconocida debe estar próxima a la verdadera potencia. Sobre el supuesto de esta potencia asumida y la potencia asignada del estándar se preparan dosis equipotentes (si es posible), esto es, que las dosis correspondientes del estándar y del desconocido se espera que den la misma respuesta. Si no se dispone de información sobre la potencia asumida, se realizan ensayos preliminares sobre un amplio rango de dosis para determinar el intervalo en el que la curva es lineal.

Cuanto más próxima esté la potencia estimada de una preparación desconocida a la potencia asumida tanto más próximas estarán las dos rectas, para lo cual deberán dar igual respuesta a igual dosis. La distancia horizontal entre las líneas representa la exactitud de la potencia estimada con respecto a la potencia asumida. A mayor distancia entre las dos líneas habrá menor exactitud en la asignación de la potencia asumida. Si la línea correspondiente a la preparación desconocida está situada a la derecha de la línea del estándar, la potencia asumida estará sobrestimada y los cálculos indicarán una potencia estimada inferior a la potencia asumida. De la misma manera, si la línea de la preparación desconocida está situada a la izquierda de la línea del estándar, la potencia asumida estará subestimada y los cálculos indicarán una potencia estimada superior a la potencia asumida.

3.2.2 *Diseño del ensayo*

Las siguientes consideraciones serán de utilidad para la optimización de la precisión del diseño del ensayo.

1) El cociente entre la pendiente y el error residual deberá ser tan grande como sea posible.
2) El intervalo de dosis deberá ser tan grande como sea posible.
3) Las líneas deberán estar tan estrechamente próximas como sea posible, es decir la potencia asumida debe ser una buena estimación de la verdadera potencia.

La distribución de las unidades experimentales (animales, tubos de ensayo, etc.) a los diferentes tratamientos puede hacerse de varias formas.

3.2.2.1 Diseño completamente aleatorizado

Si la totalidad de las unidades experimentales (animales, tubos, etc.) parece ser razonablemente homogénea sin indicación alguna de que la variabilidad de la respuesta sea menor dentro de ciertos subgrupos reconocibles, la asignación de las unidades a los diferentes tratamientos debe hacerse aleatoriamente, por ejemplo, mediante el uso de una tabla de permutaciones aleatorias.

Si es probable que las unidades en subgrupos, tales como las posiciones físicas o los días experimentales, sean más homogéneas que la totalidad de las unidades la precisión del ensayo puede aumentarse mediante la introducción de una o más restricciones en el diseño. Una cuidadosa distribución de las unidades, a partir de las restricciones, permite eliminar fuentes irrelevantes de variación.

3.2.2.2 Diseño en bloques aleatorizados

En este diseño es posible segregar una fuente identificable de variación tal como, la variación de sensibilidad entre camadas de animales experimentales o la variación entre placas de Petri en un ensayo microbiológico por difusión. El diseño requiere que todos los tratamientos se apliquen el mismo número de veces en cada bloque (camada o placa de Petri) y es adecuado solamente cuando el bloque es lo suficientemente grande como para aplicar todos los tratamientos.

Se proporcionan las fórmulas para un diseño en bloques aleatorios en este capítulo y en *770. Valoraciones microbiológicas de antibióticos*.

3.2.2.3 Diseño en cuadrado latino

Este diseño es apropiado cuando la respuesta puede verse afectada por dos fuentes diferentes de variación, cada una de las cuales puede asumir k niveles o posiciones diferentes. Por ejemplo, en una prueba en placa de un antibiótico, los tratamientos pueden disponerse en una serie $k \times k$ sobre una placa grande, realizándose cada tratamiento una vez en cada fila y en cada columna. El diseño es adecuado cuando el número de filas, el número de columnas y el número de tratamientos son iguales.

Las respuestas se registran en un formato cuadrado conocido como cuadrado latino. Las variaciones debidas a las diferencias de las respuestas entre las k filas y las k columnas pueden separarse, reduciendo por tanto el error. *Ejemplo 5-1-3*.

Cualquiera que sea el diseño usado, la asignación de unidades experimentales a los bloques debe hacerse aleatoriamente y las unidades deben mantenerse bajo condiciones uniformes tanto antes como durante el experimento.

3.2.2.4 Diseño cruzado

Este diseño es útil cuando el experimento puede subdividirse en bloques, pero es posible aplicar solamente dos tratamientos a cada bloque, por ejemplo, un bloque puede ser una sola unidad que puede probarse en dos ocasiones. El diseño pretende aumentar la precisión eliminando los efectos de las diferencias entre las unidades mientras que se equilibra el efecto de cualquier diferencia entre los niveles generales de respuesta en las dos etapas del ensayo.

Si se prueban dos dosis de un estándar y de una preparación desconocida esto se conoce como un diseño cruzado doble, mientras que un diseño que incorpora tres dosis de cada preparación es un diseño cruzado triple.

El experimento se divide en dos partes separadas por un intervalo de tiempo adecuado. Las unidades se dividen en cuatro (o seis) grupos y cada grupo recibe uno de los cuatro (o seis) tratamientos en la primera parte de la prueba. Las unidades que reciben una preparación en la primera parte de la prueba reciben la otra preparación en la segunda parte y las unidades que reciben dosis bajas en una parte de la prueba reciben dosis altas en la otra. La disposición de las dosis se muestra en la *Tabla 3.2.2.4.-I*.

Tabla 3.2.2.4. I - Disposición de dosis en un diseño cruzado

	Cruzado doble		***Cruzado triple***	
Grupo de unidades	***Tiempo I***	***Tiempo II***	***Tiempo I***	***Tiempo II***
1	S_1	T_2	S_1	T_3
2	S_2	T_1	S_2	T_2
3	T_1	S_2	S_3	T_1
4	T_2	S_1	T_1	S_3
5	-	-	T_2	S_2
6	-	-	T_3	S_1

Ver ejemplo en Statistical Methods in Biological Assay; B. J. Finney 2da ed. 1964, pag. 265 a 299.

3.2.3 *Análisis de varianza*

Esta sección proporciona las fórmulas necesarias para llevar a cabo el análisis de varianza y serán comprendidas más fácilmente haciendo referencia a los ejemplos realizados en la *Sección 5.1*. También debe hacerse referencia al glosario de símbolos (*Sección 8*).

Las fórmulas son apropiadas para análisis simétricos en los que una o más preparaciones (T, U, etc.) que van a ser examinadas, se comparan con una preparación estándar (S). Se enfatiza que las fórmulas sólo pueden emplearse si las dosis están igualmente espaciadas, si se aplican igual número de tratamientos por preparación y si

cada tratamiento es aplicado un número igual de veces. No debe procederse al empleo de las fórmulas en cualquier otra situación.

Aparte de algunos ajustes del término debido al error el análisis básico de datos procedentes de un ensayo es el mismo para diseños completamente aleatorizados, en bloque aleatorizado y en cuadrado latino. Las fórmulas para ensayos cruzados, no se ajustan enteramente a este esquema.

Habiendo considerado los puntos discutidos en la *Sección 3.1* y habiendo transformado las respuestas, si fuera necesario, debe hacerse la media de los valores para cada tratamiento y cada preparación como se muestra en la *Tabla 3.2.3.-I.* También deben calcularse los contrastes lineales los cuales se relacionan con las pendientes de las líneas (ln dosis-respuesta). En la *Tabla 3.2.3.-II* se muestran tres fórmulas adicionales que son necesarias para la realización del análisis de varianza.

Tabla 3.2.3.-I. Fórmulas aplicables al modelo de líneas paralelas con d dosis de cada preparación

	Estándar	***Preparación 1 (T)***	***Preparación 2 (U, etc.)***
Respuesta media de la dosis menor	S_1	T_1	U_1
Respuesta media de la segunda dosis	S_2	T_2	U_2
...	...	...	...
Respuesta media de la dosis mayor	S_d	T_d	U_d
Total de la preparación	$P_S = S_1+S_2+...+S_d$	$P_T = T_1+T_2+...+T_d$	$P_U = U_1+U_2+...+U_d$
Contraste lineal	$L_S = 1S_1+2S_2+...+dS_d$ - ½ $(d+1)$ Ps	$L_T = 1T_1+2T_2+...+dT_d$ - ½ $(d+1)$ P_T	$L_U = 1U_1+2U_2+...+dU_d$ - ½ $(d+1)$ P_U

Tabla 3.2.3.-II. Fórmulas adicionales para la construcción del análisis de la varianza.

$H_P = \frac{n}{d}$	$H_L = \frac{12n}{d^3 - d}$	$K = \frac{n(P_S + P_T + ...)^2}{hd}$

Tabla 3.2.3.-III. Fórmulas para el cálculo de Suma de Cuadrados y Grados de libertad.

Fuentes de Variación	***Grados de Libertad (gl)***	***Suma de Cuadrados (SC)***
Preparaciones	$h - 1$	$SC_{prep=} H_P(P_S^2+P_T^2+...) - K$
Regresión lineal	1	$SC_{reg} = \frac{1}{h} H_L (L_S + L_T + ...)^2$
Desviación del paralelismo	$h - 1$	$SC_{par=} H_L (L_S^2+L_T^2+...) - SC_{reg}$
Desviación de la linealidad	$h\,(d - 2)$	$SC_{lin=} SC_{trat} - SC_{prep} - SC_{reg} - SC_{par}$
Tratamientos	$hd - 1$	$SC_{trat=} n\,(S_1^2+...+S_d^2+T_1^2+...+T_d^2+...) - K$

(*) No se calcula para ensayos con dos dosis.

Tabla 3.2.3.-IV. Estimación del Error Residual

Fuentes de Variación		***Grados de Libertad (gl)***	***Suma de Cuadrados (SC)***
Bloques (Filas) (*)		$n - 1$	$SC_{bloques=} hd\,(R_1^2+...+R_n^2) - K$
Columnas (**)		$n - 1$	$SC_{col=} hd\,(C_1^2+...+C_n^2) - K$
Error Residual (***)	***Completamente Aleatorizado***	$hd\,(n - 1)$	$SC_{res=} SC_{total} - SC_{trat}$
	Aleatorizado en bloques	$(hd - 1)\,(n - 1)$	$SC_{res=} SC_{total} - SC_{trat} - SC_{bloques}$
	Cuadrado latino	$(hd - 2)\,(n - 1)$	$SC_{res=} SC_{total} - SC_{trat} - SC_{bloques} - SC_{col}$
Total		$nhd - 1$	$SC_{total} = \sum (y - \bar{y})^2$

(*) No se calcula para el diseño completamente aleatorizado.
(**) Sólo se calcula para el diseño Cuadrado Latino.
(***) Depende del tipo de diseño.

La variación total de la respuesta causada por los diferentes tratamientos se subdivide ahora, como se muestra en la *Tabla 3.2.3.-III*, en las sumas de cuadrados obtenidos a partir de los valores de las *Tablas 3.2.3.-I* y *3.2.3.-II*. La suma de cuadrados debida a la no linealidad se puede calcular únicamente si se incluyen por lo menos tres dosis por preparación en el ensayo.

El error residual del ensayo se obtiene restando las variaciones de las fuentes de variación, permitidas para el diseño, de la variación total de la respuesta (*Tabla 3.2.3.-IV*). En esta tabla $\bar{y}$ representa la media de todas las respuestas registradas en el ensayo. Se ha de hacer notar que para el cuadrado latino el número de respuestas replicadas (n) es igual al número de filas, columnas o tratamientos (dh).

$$CM_{fte.de\ variación} = \frac{SC_{fte.de\ variación}}{gl_{fte.de\ variación}}$$

El análisis de varianza se completa ahora como sigue. Cada suma de cuadrados se divide por el correspondiente número de grados de libertad para dar los cuadrados medios (CM).

El F calculado es el cociente entre el cuadrado medio de cada fuente de variación y el cuadrado medio del error residual (s^2). La significación de esos valores (conocida como razón F) se evalúa mediante el empleo de la *Tabla 7.1*.

$$F_{calculado} = \frac{CM_{fte.de\ variación}}{CM_{error}}$$

3.2.4 *Criterios de validez*

Se dice que los resultados de un ensayo son "estadísticamente válidos" si el resultado del análisis de varianza es el siguiente:

1) El término regresión lineal es **significativo**, es decir, la probabilidad calculada es inferior a 0 .01 ($p<0,01$). Si este criterio no se cumple, se debe considerar que el ensayo es **no válido**.

2) El término de no paralelismo es **no significativo**, es decir, la probabilidad calculada no es inferior a 0,05 ($p>0,05$). Esto indica que se satisface la condición 5A, *Sección 3.1*.

3) El término de no-linealidad es **no significativo**, es decir, la probabilidad calculada no es inferior a 0,05 ($p>0,05$). Esto indica que se satisface la condición 4A. *Sección 3.1*.

Una desviación significativa del paralelismo en un ensayo múltiple (varias preparaciones simultáneamente) puede ser debida a la inclusión en el diseño del ensayo de una preparación a examinar que da una línea ln dosis-respuesta con una pendiente diferente de la de las otras preparaciones. En lugar de declarar no válido la totalidad del ensayo se puede decidir la eliminación de todos los datos relativos a esa preparación y retomar el análisis desde el inicio.

Cuando se establece la validez estadística, las potencias y los límites de confianza se pueden estimar por los métodos descriptos en la sección siguiente.

3.2.5. *Estimación de la Potencia y Límites de Confianza*

I es el ln del cociente entre dosis adyacentes de cualquier preparación, se obtiene a partir de:

$$I = \ln \frac{(dosis\ \ 2)}{(dosis\ \ 1)} = \ln dosis\ \ 2 - \ln dosis\ \ 1 \qquad (3.2.5.\text{-}1)$$

La pendiente común b, para ensayos con d dosis de cada preparación, se obtiene a partir de la fórmula

$$b = \frac{H_L(L_S + L_T + ...)}{I\ n\ h} \qquad (3.2.5.\text{-}2)$$

El logaritmo de la relación de potencia de una preparación desconocida, por ejemplo *T,* es $M_T^{'}$

$$M_T^{'} = \frac{P_T - P_S}{d\ b} \qquad (3.2.5.\text{-}3)$$

La potencia estimada es una estimación puntual de la verdadera potencia y los límites de confianza pueden calcularse por la fórmula (*3.2.5.-4*)

$$\begin{matrix} M_T^{'}\ \sup \\ M_T^{'}\ \inf \end{matrix} = CM_T^{'} \pm \sqrt{(C-1)(CM_T^{'2} + 2V)} \qquad (3.2.5.\text{-}4)$$

Donde

$$C = \frac{SC_{reg}}{SC_{reg} - s^2 t^2} \qquad (3.2.5.\text{-}5)$$

$$V = \frac{SC_{reg}}{b^2 d\ n} \qquad (3.2.5.\text{-}6)$$

Los valores de *t* se obtienen a partir de la *Tabla 8.2* para $p = 0{,}05$ y grados de libertad igual a los del error residual.

La potencia estimada y los límites de confianza, asociados a ella, se calculan multiplicando los *antilogaritmos* de $M_T^{'}$; $M_T^{'}$ *superior y* $M_T^{'}$ *inferior* por la potencia supuesta A_T.

Potencia estimada = R_T = *antilog* $M_T^{'} \times A_T$ (*3.2.5.-7*)

Límite de confianza superior = R_T sup = *antilog* $M_T^{'}$ *sup* $\times A_T$ (*3.2.5.-8*)

Límite de confianza inferior = R_T inf = *antilog* $M_T^{'}$ *inf* $\times A_T$ (*3.2.5.9*)

Si las soluciones existentes no son equipotentes en base a potencias asumida y asignada es necesario un factor de corrección.

3.2.6 *Valores perdidos*

En un ensayo equilibrado, un accidente sin ninguna relación con los tratamientos aplicados puede llevar a la pérdida de una o más respuestas, por ejemplo debido a la muerte de un animal. Si se considera que el accidente no está relacionado de ninguna manera con la composición de la preparación administrada, los cálculos exactos pueden aún realizarse pero las fórmulas son necesariamente más complicadas y solamente se pueden dar dentro del marco de trabajo de los modelos lineales generales. No obstante, existe un método aproximado que mantiene la simplicidad del diseño equilibrado sustituyendo la respuesta perdida por un valor calculado. La pérdida de información se tiene en cuenta disminuyendo los grados de libertad de la suma total de cuadrados y para el error residual en una unidad y empleando una de las fórmulas proporcionadas más adelante para el valor perdido. Se debe tener en mente que éste es sólo un método aproximado y que debe ser preferido el método exacto.

Si se pierde más de una información se puede emplear la misma fórmula. El procedimiento consiste en hacer una estimación grosera para todos los valores perdidos excepto uno y emplear la propia fórmula apropiada para éste, empleando todos los valores restantes incluidas las estimaciones groseras. Incluir el valor calculado. Continuar de forma similar calculando un valor para la primera aproximación grosera. Después de calcular todos los valores perdidos de la misma manera se repite el ciclo completo desde el principio, empleando en cada cálculo el valor estimado o calculado más reciente para todas las respuestas a las que se está aplicando la fórmula. Se continúa hasta que dos ciclos consecutivos dan los mismos valores, normalmente la convergencia es rápida.

Siempre que el número de valores reemplazados sea pequeño con relación al número total de observaciones en el experimento completo (digamos inferior al 5 %), la aproximación implicada en este reemplazo y la reducción de grados de libertad por el número de valores perdidos así reemplazados es normalmente bastante satisfactoria. Sin embargo, el análisis debe ser interpretado con gran cuidado, especialmente si existe una preponderancia de valores perdidos en un tratamiento o bloque, y se debe consultar a un especialista en estadística si se encuentra alguna característica inusual.

Diseño completamente aleatorizado.

En un ensayo completamente aleatorizado, el valor perdido puede ser sustituido por la media aritmética de las otras respuestas al mismo tratamiento.

Diseño en bloques aleatorizados.

El valor perdido *y'* se obtiene aplicando la ecuación:

$$y' = \frac{n\ B' + k\ T' - G'}{(n-1)(k-1)} \qquad \text{(3.2.6.-I)}$$

en la que B' es la suma de las respuestas del bloque que contiene el valor perdido, T' es el total del tratamiento correspondiente y G' es la suma de todas las respuestas registradas en el ensayo.

Diseño en cuadrado latino.

El valor perdido *y'* se obtiene a partir de:

$$y' = \frac{k(B' + C' + T') - 2G'}{(k-1)(k-2)} \qquad \text{(3.2.6.-II)}$$

donde B' y C' son las sumas de las respuestas en la fila y columna que contiene el valor perdido. En este caso $k = n$.

Diseño cruzado.

Cuando accidentalmente se produce una pérdida de valores en un diseño cruzado, se debe consultar un libro de estadística (por ejemplo, *D. J. Finney*, ver *Sección 10*), ya que las fórmulas apropiadas dependen de las combinaciones particulares de tratamientos.

3.3 Modelo de relación de pendientes

3.3.1 *Introducción*

Este modelo es apropiado, por ejemplo, para algunos ensayos microbiológicos cuando la variable independiente es la concentración de un factor de crecimiento esencial por debajo de la concentración óptima del medio.

El modelo se ilustra en la *Figura 3.3.1.-I*

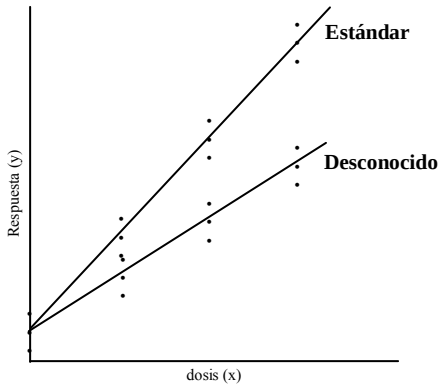


Figura 3.3.1.-I.-Modelo de relación de pendientes para un diseño 2 × 3 + 1.

Las dosis se representan en el eje de abscisas y las respuestas se representan en el eje de ordenadas. Las respuestas individuales a cada tratamiento se señalan con puntos negros. Las dos líneas son las relaciones dosis-respuesta calculadas para la preparación estándar y para la desconocida bajo el supuesto de que ambas se cortan en el cero de dosis. A diferencia del modelo de líneas paralelas, las dosis no se transforman a logaritmos.

Al igual que en el caso de un ensayo basado en el modelo de líneas paralelas, es importante que la potencia asumida esté cerca de la verdadera potencia y preparar diluciones equipotentes de las preparaciones desconocida y del estándar (si es posible). Cuanto más próxima esté la potencia asumida del desconocido a la verdadera potencia, más cerca estarán las dos líneas. La relación de las pendientes representa la "verdadera" potencia del desconocido, relativa a su potencia asumida. Si la pendiente de la preparación desconocida es mayor que la del estándar, la potencia ha sido subestimada y los cálculos indicarán una potencia estimada superior a la potencia asumida. De la misma manera, si la pendiente del desconocido es menor que la del estándar, la potencia ha sido sobrestimada y los cálculos indicarán una potencia estimada inferior a la potencia asumida.

En un ensayo todas las respuestas deben ser examinadas para que satisfagan las condiciones 1, 2 y 3 de la *Sección 3.1*. El análisis de varianza que ha de desarrollarse rutinariamente se describe en la *Sección 3.3.3*, por lo que el cumplimiento de las condiciones 4B y 5B de la *Sección 3.1* puede ser examinado.

3.3.2 *Diseño del ensayo*

El empleo del análisis estadístico presentado más adelante, impone las siguientes restricciones al ensayo:

a) El estándar y las preparaciones a ensayar tiene que ser analizadas en el mismo número de diluciones igualmente espaciadas;

b) Un grupo extra de unidades experimentales que no reciben tratamiento pueden ser examinadas (los blancos);

c) Tiene que haber un número igual de unidades experimentales para cada tratamiento.

Como ya se señalo en la *Sección 3.1.3* los diseños de ensayo que no cumplen estas restricciones pueden ser posibles y correctos, pero los análisis estadísticos sencillos presentados aquí no son aplicables y ha de solicitarse el consejo de un experto o emplearse un programa apropiado.

Un diseño con dos dosis por preparación y un blanco, "diseño cero común (*h2 + 1*)"es normalmente preferido, ya que permite una mayor precisión juntamente con la posibilidad de revisar la validez dentro de las restricciones mencionadas arriba. Sin embargo, una relación lineal no puede ser siempre asumida como válida por debajo de dosis cero. Se puede adoptar, con una pequeña pérdida de precisión, un diseño sin blancos. En este caso se prefiere tres dosis por preparación, "diseño cero común (*h3*)", al de dos dosis por preparación. Estas dosis son, así, dadas como sigue:

1) El estándar se da en una dosis alta, próxima, pero sin exceder la dosis máxima que da una respuesta media sobre el tramo recto de la línea dosis-respuesta.

2) Las otras dosis están uniformemente espaciadas entre la dosis más alta y la dosis cero.

3) Las preparaciones desconocidas se dan en las dosis correspondientes, basándose en la potencia asumida del material.

Puede emplearse un diseño completamente aleatorizado, un diseño en bloques aleatorizados o un diseño en cuadrado latino tal como se describe en la *Sección 3.2.2*. El empleo de cualquiera de estos diseños necesita un ajuste de la suma de cuadrados del error como se describe para el análisis basado en el modelo de rectas paralelas. Se describe más adelante el análisis de un ensayo de una o más preparaciones desconocidas frente a un estándar.

3.3.3 Análisis de varianza

3.3.3.1 Diseño (hd + 1)

Las respuestas se analizan como se describe en la *Sección 3.1* y si es necesario se transforman. Las respuestas son entonces promediadas sobre cada tratamiento y cada preparación como se indica en la *Tabla 3.3.3.1-I.* Adicionalmente se calcula la respuesta media de los blancos (*B*).

La suma de cuadrados en el análisis de varianza se calcula como se indica en las *Tablas 3.3.3.1-I* a *3.3.3.1-III*. La suma de cuadrados debida a no linealidad puede ser calculada sólo si han sido incluidas al menos tres dosis de cada preparación en el ensayo. El error residual se obtiene restando las variaciones de las fuentes de variación contempladas en el diseño de la variación total de la respuesta (*Tabla 3.3.3.1-IV*).

El análisis de varianza se completa ahora como sigue. Cada suma de cuadrados se divide por el correspondiente número de grados de libertad para dar los cuadrados medios (CM).

$$CM_{fte.de\,\text{var}iación} = \frac{SC_{fte.de\,\text{var}iación}}{gl_{fte.de\,\text{var}iación}}$$

El *F* calculado es el cociente entre el cuadrado medio de cada fuente de variación y el cuadrado medio del error residual (s^2). La significación de esos valores (conocida como razón *F*) se evalúa mediante el empleo de la *Tabla 7.1.*

$$F_{calculado} = \frac{CM_{fte.de\,\text{var}iación}}{CM_{error}}$$

Tabla 3.3.3.1.-I.
Fórmulas aplicables al modelo de Relación de pendientes con d dosis para cada preparación y un blanco

	Estándar	***Preparación* 1 (*T*)**	***Preparación* 2 (*U, etc.*)**
Respuesta media de la dosis menor	S_1	T_1	U_1
Respuesta media de la segunda dosis	S_2	T_2	U_2
...	...	...	...
Respuesta media de la dosis mayor	S_d	T_d	U_d
Total de la preparación	$P_S = S_1+S_2+...+S_d$	$P_T = T_1+T_2+...+T_d$	$P_U = U_1+U_2+...+U_d$
Contraste lineal	$L_S = 1S_1+2S_2+...+dS_d$	$L_T = 1T_1+2T_2+...+dT_d$	$L_U = 1U_1+2U_2+...+dU_d$
Valor de la intersección	$a_S = (4d + 2)P_S - 6L_S$	$a_T = (4d + 2)P_T - 6L_T$	$a_U = (4d + 2)P_U - 6L_U$
Valor de la pendiente	$b_S = 2L_S - (d + 1)P_S$	$b_T = 2L_T - (d + 1)P_T$	$b_U = 2L_U - (d + 1)P_U$
Valor del tratamiento	$G_S = S_1^2 + ... + S_d^2$	$G_T = T_1^2 + ... + T_d^2$	$G_U = U_1^2 + ... + U_d^2$
***No linealidad* (*)**	$J_S = G_S - \frac{P_S^2}{d} - \frac{3\ b_S^2}{d^3 - d}$	$J_T = G_T - \frac{P_T^2}{d} - \frac{3\ b_T^2}{d^3 - d}$	$J_U = G_U - \frac{P_U^2}{d} - \frac{3\ b_U^2}{d^3 - d}$

(*) No calculado para ensayos de dos dosis

Tabla 3.3.3.1.-II. Fórmulas adicionales para la construcción del análisis de la varianza.

$H_B = \frac{nhd^2 - nhd}{hd^2 - hd + 4d + 2}$	$H_I = \frac{n}{4d^3 - 2d^2 - 2d}$	$a = \frac{a_S + a_T + ...}{h(d^2 - d)}$	$K = \frac{n(B + P_S + P_T + ...)^2}{hd + 1}$

Tabla 3.3.3.1.-III. Fórmulas para el cálculo de Suma de Cuadrados y Grados de libertad.

Fuentes de Variación	***Grados de Libertad* (*gl*)**	***Suma de Cuadrados* (*SC*)**
Regresión	h	$SC_{reg} = SC_{trat} - SC_{blanco} - SC_{int} - SC_{lin}$
Blancos	1	$SC_{Blancos} = H_B (B - a)^2$
Intersección	h - 1	$SC_{int} = H_I((a_S^2+a_T^2+...) - h\ (d^2 - d)^2\ a^2)$
***No linealidad* (*)**	$h\ (d$ - 2$)$	$SC_{lin} = n\ (J_S + J_T + ...)$
Tratamientos	hd	$SC_{trat} = n\ (B^2 + G_S + G_T + ...)$ - K

(*) No calculado para ensayos de dos dosis

Tabla 3.3.3.1.-IV. Estimación del Error Residual

Fuentes de Variación	***Grados de Libertad (g)***	***Suma de Cuadrados (SC)***
Bloques (Filas) (*)	$n-1$	$SC_{bloques} = hd\,(R_1^2+\ldots+R_n^2) - K$
Columnas (**)	$n-1$	$SC_{col} = hd\,(C_1^2+\ldots+C_n^2) - K$
Error Residual (***) ***Completamente Aleatorizado***	$(hd+1)(n-1)$	$SC_{res} = SC_{total} - SC_{trat}$
Error Residual (***) ***Aleatorizado en bloques***	$hd\,(n-1)$	$SC_{res} = SC_{total} - SC_{trat} - SC_{bloques}$
Error Residual (***) ***Cuadrado latino***	$(hd-1)(n-1)$	$SC_{res} = SC_{total} - SC_{trat} - SC_{bloques} - SC_{col}$
Total	$nhd + n - 1$	$SC_{total} = \sum (y-\bar{y})^2$

(*) No se calcula para el diseño completamente aleatorizado.
(**) Sólo se calcula para el diseño Cuadrado Latino.
(***) Depende del tipo de diseño.

3.3.3.2 Diseño (hd)

Las fórmulas son básicamente las mismas que las empleadas para el diseño (hd + 1), pero existen algunas pequeñas diferencias.

- B es descartado en la totalidad de las fórmulas.
- $K = \dfrac{n(P_S + P_T + \ldots)^2}{hd}$
- SC_{blanco} se elimina del análisis de varianza.
- El número de grados de libertad para los tratamientos se transforma en $hd - 1$.
- El número de grados de libertad del error residual y la varianza total se calcula de la forma descripta para el modelo de líneas paralelas (ver *Tabla 3.2.3.-IV*)

La validez del ensayo, la potencia y el intervalo de confianza se determinan como se describe en las *Secciones 3.3.4* y *3.3.5*.

3.3.4 *Criterios de validez*

Se dice que los resultados del ensayo son "estadísticamente válidos" cuando el resultado del análisis de varianza es como sigue:

1) la variación debida a los blancos en los diseños (hd + 1) es **no significativa**, es decir, la probabilidad calculada es no inferior a 0,05. Esto indica que la respuesta de los blancos no difiere significativamente del punto de intersección común y la relación lineal es válida hacia la dosis cero.

2) la variación debida a la intersección es **no significativa**, es decir, la probabilidad calculada es no inferior a 0,05. Esto indica que se satisface la condición 5B de la *Sección 3.1*.

3) en ensayos que incluyen al menos tres dosis por preparación, la variación debida a la no linealidad es **no significativa**, es decir, la probabilidad calculada es no inferior a 0,05. Esto indica que se satisface la condición 4B de la *Sección 3.1*.

Una variación significativa debida a los blancos indica que la hipótesis de linealidad es no válida cerca de la dosis cero. Si es probable que esto sea más sistemático que accidental, para el tipo de ensayo, el diseño *hd* es más apropiado. Cualquier respuesta a los blancos debe ser entonces no considerada.

Cuando estos ensayos indican que el ensayo es válido, se calcula la potencia con sus límites de confianza, como se describe en la *Sección 3.3.5*.

3.3.5 *Estimación de la potencia y límites de confianza*

3.3.5.1 Diseño (hd + 1)

La intersección común a' de las preparaciones se puede calcular a partir de

$$a' = \frac{(2d+1)B + (2d-3)ha}{h(2d-3) + 2d + 1} \qquad (3.3.5.1.\text{-}1)$$

La pendiente del estándar, y análogamente para cada una de las otras preparaciones, se calcula a partir de la fórmula (*3.3.5.1.-2*) con su correspondiente L_S, L_T, L_U…

$$b'_S = \frac{6L_S - 3d(d+1)a'}{2d^3 + 3d^2 + d} \qquad (3.3.5.1.\text{-}2)$$

La relación de potencia para cada preparación desconocida se puede calcular ahora de

$$R'_T = \frac{b'_T}{b'_S} \qquad (3.3.5.1.\text{-}3)$$

la cual ha de ser multiplicada por A_T, la potencia asumida de la preparación a ensayar, para determinar la potencia estimada R_T. Si el paso entre dosis adyacentes no fuera idéntico para el estándar y la preparación desconocida, la potencia tiene que ser multiplicada por I_S/I_T. Nótese que a diferencia del análisis de líneas paralelas, no se calculan antilogaritmos.

El intervalo de confianza para R'_T se calcula a partir de

$$CR'_T - K' \pm \sqrt{(C-1)(CR'^2_T + 1) + K'(K' - 2CR'_T)} \qquad (3.3.5.1.\text{-}4)$$

Donde $$C = \frac{b'^2_S}{b'^2_S - s^2 t^2 V_1}$$

y $$K' = (C-1)\,V_2$$

V_1 y V_2 están relacionados con la varianza y covarianza del numerador y del denominador de R'_T. Se pueden obtener a partir de

$$V_1 = \frac{6}{n(2d+1)}\left[\frac{1}{d(d+1)} + \frac{3}{2(2d+1) + hd(d-1)}\right] \qquad (3.3.5.1.\text{-}5)$$

$$V_2 = \frac{3d(d+1)}{(3d+1)(d+2) + hd(d-1)} \qquad (3.3.5.1.\text{-}6)$$

Los límites de confianza se multiplican por A_T, y si es preciso por I_S/I_T.

3.3.5.2 Diseño (hd)

Las fórmulas son las mismas que para el diseño (*hd + 1*), con las siguientes modificaciones

$$a' = a \qquad (3.3.5.2.\text{-}1)$$

$$V_1 = \frac{6}{nd(2d+1)}\left[\frac{1}{d+1} + \frac{3}{h(d-1)}\right] \qquad (3.3.5.2.\text{-}2)$$

$$V_2 = \frac{3(d+1)}{3(d+1) + h(d-1)} \qquad (3.3.5.2.\text{-}3)$$

4 ENSAYOS QUE DEPENDEN DE RESPUESTAS CUANTALES

4.1 Introducción

En ciertos ensayos es imposible o excesivamente laborioso medir el efecto sobre cada unidad experimental en una escala cuantitativa. En cambio, un efecto (respuesta) tal como la muerte o síntomas de hipoglucemia, se pueden observar como que "ocurren" o "no ocurren" en cada unidad y el resultado depende del número de unidades en las cuales ocurre. Tales ensayos se llaman cuantales o del todo-o-nada.

La situación es muy similar a lo descripto para ensayos cuantitativos en la *Sección 3.1*, pero en lugar de *n* respuestas separadas para cada tratamiento se registra un valor único, esto es, la fracción de unidades en cada grupo de tratamiento que muestra una respuesta. Cuando estas fracciones son representadas frente al logaritmo de las dosis la curva resultante tiende a ser sigmoidea más que lineal. Se emplea una función matemática que represente esta curvatura sigmoidea para estimar la curva dosis-respuesta. La función más comúnmente empleada es la función de distribución normal acumulada. Esta función tiene ventajas teóricas y es quizá la mejor elección si la respuesta es un reflejo de la tolerancia de las unidades. Si la respuesta tiende más a depender de un proceso de crecimiento, se prefiere el modelo de distribución logística, aunque entre los dos modelos la diferencia en el resultado es muy pequeña.

Los estimadores de máxima verosimilitud de la pendiente y localización de las curvas se pueden determinar únicamente aplicando un procedimiento iterativo. Existen muchos procedimientos que conducen al mismo resultado, pero difieren en eficiencia debido a la velocidad de convergencia. Uno de los métodos más rápidos es la optimización directa de la función de máxima verosimilitud, lo cual puede ser fácilmente realizado con programas de computación que contengan un procedimiento interno elaborado con esta finalidad. Desafortunadamente, la mayoría de estos procedimientos no proporcionan una estimación del intervalo de confianza y la técnica de obtención es demasiado complicada para ser descripta aquí. La técnica descripta a continuación no es la más rápida pero ha sido elegida por su simplicidad comparada con las otras alternativas. Puede ser empleada en ensayos en los que una o más preparaciones se comparan al estándar en los que además han de cumplimentarse las siguientes condiciones:

1) La relación entre el logaritmo de la dosis y la respuesta se puede representar por una curva de distribución normal acumulada.
2) Las curvas para el estándar y para la preparación muestra son paralelas, es decir, tienen una forma idéntica y pueden diferir solamente en su localización horizontal.
3) En teoría, naturalmente no hay respuesta a dosis extremadamente bajas y no hay respuesta a dosis extremadamente altas.

4.2 Método de probitos

La curva sigmoidea se puede transformar en una recta sustituyendo cada respuesta, esto es la proporción de respuestas positivas por grupo, por el correspondiente valor de la distribución normal estándar acumulada. Este valor, a menudo llamado"normito", toma valores teóricos entre $-\infty$ a $+\infty$. Tiempo atrás se proponía añadir 5 a cada normito para obtener "probito". Esto facilitaba los cálculos hechos a mano ya que se evitaban los valores negativos. Con la llegada de las computadoras la necesidad de sumar 5 a los normitos ha desaparecido. El término "método de normitos" sería más apropiado para el método descripto a continuación. No obstante, ya que el termino "análisis de probitos" está tan ampliamente difundido se mantendrá dicho término en el texto por razones históricas.

Una vez que las respuestas han sido linealizadas, debiera ser posible aplicar el análisis de líneas paralelas como se describe en la *Sección 3.2*. Desafortunadamente, la validez de condición de homogeneidad de la varianza para cada dosis no se cumple. La varianza es mínima para normito = 0 y crece para valores tanto positivos como negativos del normito. Por tanto, es necesario dar más peso a las respuestas en la parte media de la curva y menos peso en las partes más extremas de la misma. Este método, el análisis de varianza, la estimación de la potencia y del intervalo de confianza se describen a continuación.

4.2.1 Tabulación de resultados

La *Tabla 4.2.1.-I* se emplea para introducir datos en las columnas indicadas por números:

(1) Dosis del estándar o de la preparación desconocido
(2) Número *n* de unidades sometidas a ese tratamiento.
(3) Número de unidades *r* que dan respuesta positiva al tratamiento.
(4) Logaritmo *x* de la dosis.

(5) Proporción $p = r / n$ de respuestas positivas por grupo.

El primer ciclo empieza aquí.

(6) La columna Y se completa con ceros en la primera iteración.

(7) El valor correspondiente a $\Phi = \Phi(Y)$ de la función de distribución normal estándar acumulada (ver *Tabla 7.4*).

Las columnas (8) a (10) se calculan con las siguientes fórmulas:

$$Z = \frac{e^{-Y^2/2}}{\sqrt{2\pi}} \qquad (8) \qquad (4.2.1.\text{-}1)$$

$$y = Y + \frac{p - \Phi}{z} \qquad (9) \qquad (4.2.1.\text{-}2)$$

$$w = \frac{n\ z^2}{\Phi - \Phi^2} \qquad (10) \qquad (4.2.1.\text{-}3)$$

Las columnas (11) a (15) se pueden calcular fácilmente a partir de las columnas (4), (9) y (10) como wx, wy, wx^2, wy^2 y wxy respectivamente y la sumatoria de cada una de las columnas (10) a (15) se calcula separadamente para cada una de las preparaciones.

Las sumas calculadas en la *Tabla 4.2.1.-I* se transfieren a las columnas (1) a (6) de la *Tabla 4.2.1.-II* y se calculan seis columnas adicionales (7) a (12) como sigue.

Tabla 4.2.1.-I Primer tabla de trabajo

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
	dosis	n	r	x	p	Y	Φ	Z	y	w	wx	wy	wx^2	wy^2	wxy
S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
										$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$
T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
										$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$	$\Sigma =$
etc.															

Tabla 4.2.1.-II Segunda tabla de trabajo

	(1) Σw	(2) Σwx	(3) Σwy	(4) Σwx^2	(5) Σwy^2	(6) Σwxy	(7) S_{xx}	(8) S_{xy}	(9) S_{yy}	(10) $\bar{x}$	(11) $\bar{y}$	(12) a
S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
etc.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
							$\Sigma =$	$\Sigma =$				

$$S_{xx} = \sum wx^2 - \frac{(\sum wx)^2}{\sum w} \qquad (7) \qquad (4.2.1.\text{-}4)$$

$$S_{xy} = \sum wxy - \frac{(\sum wx)(\sum wy)}{\sum w} \qquad (8) \qquad (4.2.1.\text{-}5)$$

$$S_{yy} = \sum wy^2 - \frac{(\sum wy)^2}{\sum w} \qquad (9) \qquad (4.2.1.\text{-}6)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum wx}{\sum w} \qquad (10) \qquad (4.2.1.\text{-}7)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum wy}{\sum w} \qquad (11) \qquad (4.2.1.\text{-}8)$$

La pendiente común, *b* puede obtenerse ahora así

$$b = \frac{\sum S_{xy}}{\sum S_{xx}} \qquad (4.2.1.\text{-}9)$$

la intersección "*a*" del estándar y de las preparaciones desconocidas, se obtienen como

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \qquad (12) \qquad (4.2.1.\text{-}10)$$

La columna (6) de la primera tabla de trabajo puede ser ahora sustituida por $Y = a + bx$ y el ciclo se va repitiendo hasta que la diferencia entre dos ciclos se ha hecho pequeña (por ejemplo, la máxima diferencia de *Y* entre dos ciclos consecutivos es inferior a 10^{-8}).

4.2.2 Criterios de validez

Antes de calcular las potencias e intervalos de confianza, debe ser evaluada la validez del ensayo. Si se han incluido al menos tres dosis para cada preparación, las desviaciones de la linealidad se pueden medir como sigue: añadir una columna 13 a la *Tabla 4.2.1.-II* y completarla según la expresión:

$$S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} \qquad (4.2.2.\text{-}1)$$

El total de columna es una medida de las desviaciones de la linealidad y se distribuye, aproximadamente, como una χ^2 con $N - 2h$ grados de libertad. La significación de este valor puede establecerse con la *Tabla 7.3* o con una adecuada subrutina en un programa de computación. Si el valor es significativo a un nivel de probabilidad de 0,05, el ensayo debe probablemente ser rechazado (ver *Sección 4.2.4*).

Cuando el ensayo anterior no indica desviación significativa de regresión lineal, se contrastan las desviaciones del paralelismo, a un nivel de significación del 0,05, con:

$$\chi^2 = \Sigma \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}} - \frac{(\sum S_{xy})^2}{\sum S_{xx}} \qquad (4.2.2.\text{-}2)$$

Con $h - 1$ grados de libertad.

4.2.3 Estimación de la potencia y límites de confianza

Cuando no se detecta desviación significativa del paralelismo y la linealidad, el ln (relación de potencia) M'_T se calcula como:

$$M_T' = \frac{a_T - a_S}{b} \qquad (4.2.3.\text{-}1)$$

Se aplica el antilogaritmo. Ahora se considera $t = 1{,}96$ y $s = 1$.
Los límites de confianza se calculan como los antilogaritmos de:

$$CM_T' - (C-1)(\bar{x}_S - \bar{x}_T) \pm \sqrt{(C-1)(V\sum S_{xx} + C(M_T' - \bar{x}_S + \bar{x}_T)^2)} \qquad (4.2.3.\text{-}2)$$

donde $$C = \frac{b^2 \sum S_{xx}}{b^2 \sum S_{xx} - s^2 t^2}$$

y $$V = \frac{1}{\sum_S w} + \frac{1}{\sum_T w}$$

4.2.4 Ensayos no válidos

Si la prueba de desviación de la linealidad, descripta en la *Sección 4.2.2*., es significativa el ensayo deberá normalmente ser rechazado. Si existieran razones para mantener el ensayo, las fórmulas se modificarán ligeramente, t se toma como el valor t ($p = 0{,}05$) con el mismo número de grados de libertad utilizado en la revisión de la linealidad y s^2 pasa a ser el valor χ^2 dividido por el mismo número de grados de libertad (por ello es mayor que uno).

La prueba de paralelismo también se modifica ligeramente. El valor χ^2 para no paralelismo se divide por su número de grados de libertad. El valor resultante se divide por s^2 calculado anteriormente para obtener la razón F, con $h - 1$ y $N - 2h$ grados de libertad, el cual es evaluado de la forma habitual al 0,05 de nivel de significación.

4.3 Métodos de logitos

Como se indicó en la *Sección 4.1* el método de logitos puede ser algunas veces más apropiado. El nombre de este método se deriva de la función logit, que es la inversa de la función de distribución logística. El procedimiento es similar al descripto para el método probitos con las modificaciones siguientes en las formulas para Φ y Z.

$$\Phi = \frac{1}{1 + e^{-Y}} \qquad (4.3.\text{-}1)$$

$$Z = \frac{e^{-Y}}{(1 + e^{-Y})^2} \qquad (4.3.\text{-}2)$$

4.4 Otras formas de la curva

Los métodos de probitos y logitos son casi siempre adecuados para el análisis de las llamadas respuestas cuantales en la FA. Sin embargo, si puede ser evidente que la curva ln dosis-respuesta tiene una forma diferente de la que describen las dos curvas anteriores, se puede adoptar otra curva Φ. En este caso Z se toma como la primera derivada de Φ.

Por ejemplo: si puede mostrarse que la curva no es simétrica, la distribución de Gompertz podría ser apropiada (método de gompito) en este caso

$$\Phi = 1 - e^{-e^Y}$$

$$Z = e^{Y - e^Y}$$

4.5 Dosis mediana efectiva

En algunos tipos de ensayos interesa determinar la dosis mediana efectiva, que es la dosis que produce una respuesta en el 50 % de las unidades. Se puede utilizar el método de probitos para determinar esta dosis mediana

efectiva (ED50), pero ya que no es necesario expresar esta dosis relativa a un estándar, las fórmulas son ligeramente diferentes.

[NOTA: se puede incluir opcionalmente un estándar con objeto de validar el ensayo. Normalmente el ensayo se considera válido si el valor calculado ED50 del estándar está suficientemente cercano al valor asignado ED50. El significado de "suficientemente cercano", en este contexto, depende de los requerimientos especificados en la monografía.]

La tabulación de las respuestas para las preparaciones desconocidas y opcionalmente para el estándar, se hace como se describe en la *Sección 4.2.1*. La prueba de linealidad es como se describe en la *Sección 4.2.2*. Para este tipo de ensayo no es necesario una prueba de paralelismo. La ED50 de la preparación desconocida T y análogamente de las otras muestras se obtiene, como se describe en la *Sección 4.2.3*, con las siguientes modificaciones en las fórmulas *4.2.3.-1* y *4.2.3.-2*.

$$M_T^{'} = \frac{-a_T}{b} \qquad (4.5.\text{-}1)$$

$$CM_T^{'} - (C-1)\bar{x}_T \pm \sqrt{(C-1)(V\sum S_{xx} + C(M_T^{'} + \bar{x}_T)^2)} \qquad (4.5.\text{-}2)$$

donde

$$V = \frac{1}{\sum_T w}$$

y C se deja sin modificar

5 EJEMPLOS

5.1 Modelo de líneas paralelas

5.1.1 *Ensayo múltiple de tres dosis con diseño completamente aleatorizado.*

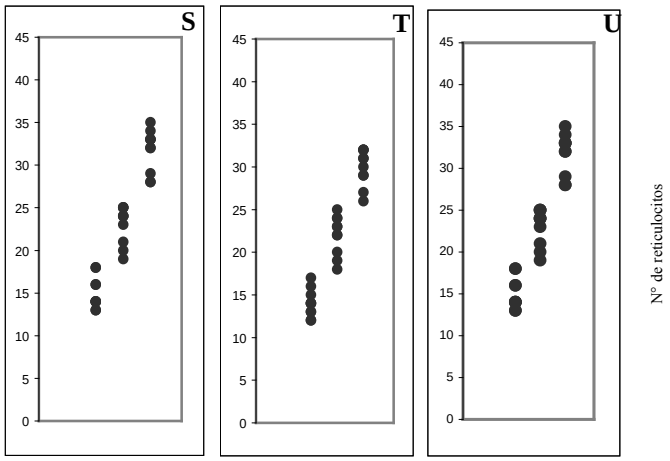
Ensayo de eritropoyetina mediante inyección subcutánea en ratones normocitémicos con recuento visual de la respuesta (*número de reticulocitos*) *en cámara de Neubauer.*

La potencia asumida de las preparaciones *T* y *U* es de 2000 UI/ml. Las dosis del estándar y preparaciones son 10, 30 y 90 UI/0,5ml/ratón. Las respuestas individuales y medias están dadas, para cada preparación en la *Tabla 5.1.1.-I* y representadas en la *Figura 5.1.1.-I*.

Tabla 5.1.1.-I Respuesta(*y*) *número de reticulocitos*

	Estándar S			***Preparación T***			***Preparación U***		
	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3	U_1	U_2	U_3
	13	25	34	14	20	27	17	25	34
	14	19	32	12	18	26	15	28	37
	18	21	33	15	23	29	16	27	35
	14	20	29	12	24	32	20	25	36
	14	24	28	14	19	30	18	29	35
	16	24	32	14	23	32	17	26	40
	13	23	33	17	22	29	17	27	39
	16	25	28	13	24	31	15	24	37
	14	25	33	16	22	32	19	25	39
	18	24	35	13	25	31	17	26	39
Media	**15**	**23**	**31,7**	**14**	**22**	**29**	**17,1**	**26,2**	**37,1**

Figura 5.1.1-I



Las fórmulas de las *Tablas 3.2.3.-I* y *3.2.3.-II* proporcionan:

$P_S = 69{,}7$ $\quad L_S = 16{,}7$

$P_T = 65{,}9$ $\quad L_T = 15{,}9$

$P_U = 80{,}4$ $\quad L_U = 20{,}0$

$H_P = \frac{10}{3} = 3{,}333333$ $\quad H_L = \frac{120}{24} = 5$

$K = 51840$

El análisis de varianza se puede ahora completar con las fórmulas de las *Tablas 3.2.3.-III* y *3.2.3.-IV*. Este se muestra en la *Tabla 5.1.1.-II*.

Tabla 5.1.1.-II. Análisis de varianza

Fuente de variación	***Grado de libertad***	***Suma de cuadrados***	***Cuadrado medio***	***Razón F***	***Probabilidad***
Preparaciones	2	376,8614	188,4307		
Regresión	1	4611,2667	4611,2667	1137,3768	0,0000
No paralelismo	2	47,2333	23,6165	5,8250	0,0043
No linealidad	3	6,2386	2,0795	0,5129	0,6745
Tratamientos	8	5041,6			
Error Residual	81	328,4	4,0543		
Total	89	5370			

El análisis confirma una regresión lineal altamente significativa. La falta de paralelismo es también significativa (p = 0,0043). La preparación U es por tanto rechazada y el análisis se repite utilizando únicamente la preparación *T* y la preparación estándar. El valor K es ahora 30645,6.

Tabla 5.1.1.-III. Análisis de varianza

Fuente de variación	***Grado de libertad***	***Suma de cuadrados***	***Cuadrado medio***	***Razón F***	***Probabilidad***
Preparaciones	1	24,0636	24,0600		
Regresión	1	2656,9000	2656,9000	585,6070	0,0000
No paralelismo	1	1,6000	1,6000	0,3527	0,5551
No linealidad	2	0,8364	0,4182	0,0922	0,9120
Tratamientos	5	2683,4			
Error Residual	54	245,0	4,5370		
Total	59	2928,4			

El análisis sin la preparación *U* cumple los requerimientos con respecto a la regresión, linealidad y paralelismo por lo tanto la potencia puede ser calculada. Aplicando las fórmulas de la *Sección 3.2.5* se obtiene:

Para la pendiente común

$$b = \frac{5 \times (16{,}7 + 15{,}9)}{\ln 3 \times 10 \times 2} = 7{,}4148$$

El ln de la relación de potencias es

$$M_T^{'} = \frac{65{,}9 - 69{,}7}{3 \times 7{,}4184} = -0{,}1707$$

$$C = \frac{2656{,}9}{2656{,}9 - 4{,}5370 \times 2{,}005^2} = 1{,}0069$$

$$V = \frac{2656{,}9}{7{,}4184^2 \times 3 \times 10} = 1{,}6093$$

Los ln de los límites de confianza para la preparación *T* son:

$$-0{,}1719 \pm \sqrt{0{,}0069 \times (0{,}0293 + 3{,}2186)} = -0{,}1719 \pm 0{,}1497$$

Tomando antilogaritmos encontramos una relación de potencias de 0,8430 con límites de confianza, del 95 por ciento, de 0,7250 y 0,9780.

Multiplicando por la potencia asumida de la preparación *T* resulta una potencia de 1686 UI/ml con límites de confianza, del 95 por ciento, de 1450 y 1956 UI/ml.

5.1.2 *Ensayo múltiple de cinco dosis con diseño completamente aleatorizado*

Ensayo in vitro de tres vacunas de hepatitis B frente a un estándar

De cada una de las vacunas y del estándar se prepararon tres series independientes de cinco diluciones, en progresión geométrica (al medio). Después de algunos pasos adicionales en el procedimiento del ensayo, se midieron las absorbancias. Los resultados se muestran en la *Tabla 5.1.2.-I.*

Tabla 5.1.2.-I. Densidades ópticas

Dilución	***Estándar S***			***Preparación T***			***Preparación U***			***Preparación V***		
1:16000	0,043	0,045	0,051	0,097	0,097	0,094	0,086	0,071	0,073	0,082	0,082	0,086
1:8000	0,093	0,099	0,082	0,167	0,157	0,178	0,127	0,146	0,133	0,145	0,144	0,173
1:4000	0,159	0,154	0,166	0,327	0,355	0,345	0,277	0,268	0,269	0,318	0,306	0,316
1:2000	0,283	0,295	0,362	0,501	0,665	0,576	0,586	0,489	0,546	0,552	0,551	0,624
1:1000	0,514	0,531	0,545	1,140	1,386	1,051	0,957	0,866	1,045	1,037	1,039	1,068

Es conocido que los logaritmos de las densidades ópticas tienen una relación lineal con los logaritmos de las dosis. En la *Tabla 5.1.2.-II* figuran las respuestas medias de las densidades ópticas logaritmicamente transformadas.

Tabla 5.1.2.-II. Medias de las transformaciones ln de las absorbancias

$\mathbf{S_1}$	-3,075	$\mathbf{T_1}$	-2,343	$\mathbf{U_1}$	-2,572	$\mathbf{V_1}$	-2,485
$\mathbf{S_2}$	-2,396	$\mathbf{T_2}$	-1,789	$\mathbf{U_2}$	-2,002	$\mathbf{V_2}$	-1,874
$\mathbf{S_3}$	-1,835	$\mathbf{T_3}$	-1,073	$\mathbf{U_3}$	-1,305	$\mathbf{V_3}$	-1,161
$\mathbf{S_4}$	-1,166	$\mathbf{T_4}$	-0,550	$\mathbf{U_4}$	-0,618	$\mathbf{V_4}$	-0,554
$\mathbf{S_5}$	-0,635	$\mathbf{T_5}$	0,169	$\mathbf{U_5}$	-0,048	$\mathbf{V_5}$	0,047

Las fórmulas de las *Tablas 3.2.3.-I* y *3.2.3.-II* proporcionan:

P_S = -9,108 L_S = 6,109

P_T = -5,586 L_T = 6,264

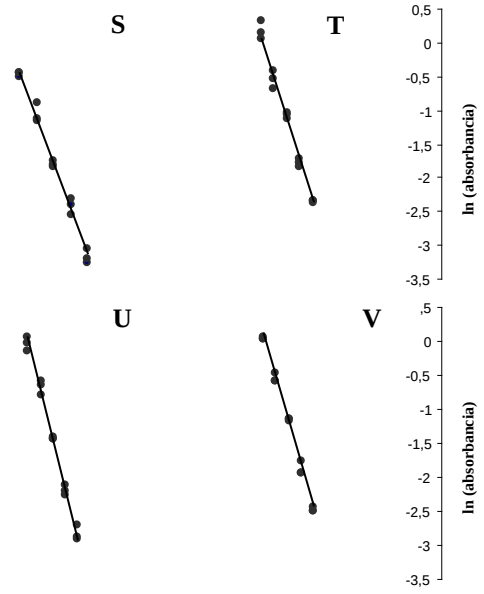
P_U = -6,544 L_U = 6,431

P_V = -6,027 L_V = 6,384

$H_P = \frac{3}{5} = 0{,}6$ $H_L = \frac{36}{120} = 0{,}3$

K = 111,52

Figura 5.1.2.-I



El análisis de varianza ya puede ser completado con las fórmulas de las *Tablas 3.2.3.-III* y *3.2.3.-IV*. El resultado se presenta en la *Tabla 5.1.2.-III*.

Tabla 5.1.2.-III. Análisis de varianza

Fuente de variación	***Grado de libertad***	***Suma de cuadrados***	***Cuadrado medio***	***Razón F***	***Probabilidad***
Preparaciones	3	4,475	1,492		
Regresión	1	47,58	47,58	7126	0,000
No paralelismo	3	0,0187	0,006	0,933	0,434
No linealidad	12	0,0742	0,006	0,926	0,531
Tratamientos	19	52,152			
Error Residual	40	0,267	0,0067		
Total	59	52,42			

Una regresión altamente significativa y un desvío de paralelismo y linealidad no significativa, confirma que las potencias pueden ser calculadas satisfactoriamente. Aplicando las fórmulas de la *Sección 3.2.5* dan:

$$b = \frac{0{,}3 \times (6{,}109 + 6{,}264 + 6{,}431 + 6{,}384)}{\ln 2 \times 3 \times 4} = 0{,}90848$$

El ln de la relación de potencias para la preparación *T* es

$$M_T' = \frac{-5{,}586-(-9{,}108)}{5\times 0{,}90848} = 0{,}7752$$

$$C = \frac{47{,}58}{47{,}58 - 0{,}0067\times 2{,}021^2} = 1{,}00057$$

$$V = \frac{47{,}58}{0{,}9085^2\times 5\times 3} = 3{,}8436$$

Los ln de los límites de confianza para la preparación *T* son

$$1{,}00057\times 0{,}7752 \pm \sqrt{0{,}00057\times(1{,}00057\times 0{,}7752^2 + 2\times 3{,}8436)} = 0{,}7756 \pm 0{,}0689$$

Tomando antilogaritmos se calcula una relación de potencias de 2,171 con límites de confianza, del 95 por ciento, de 2,027 y 2,327. Todas las muestras tienen una potencia asignada de 20 µg proteína/ml y por tanto una potencia de 43,4 µg proteína/ml se encuentra para la preparación desconocida *T* con límites de confianza, del 95 por ciento, de 40,5 y 46,5 µg proteína/ml.

El mismo procedimiento se sigue para estimar la potencia y los límites de confianza de las otras preparaciones ensayadas. Los resultados se muestran en la *Tabla 5.1.2.-IV*.

Tabla 5.1.2.-IV

Potencia final estimada e intervalos de confianza del 95% del ensayo de vacunas (*en µg proteína/ml*)

	Límite inferior	***Estimación***	***Límite superior***
Vacuna T	40,5	43,4	46,5
Vacuna U	32,9	35,2	37,6
Vacuna V	36,8	39,4	42,2

5.1.3 Ensayo de dos dosis con diseño de cuadrado latino y sin replicación

Ensayo de Ocitocina usando órgano aislado

Tabla 5.1.3.-I Disposiciones de tratamientos (*Cuadrado latino*)

	Columnas			
Filas	**1**	**2**	**3**	**4**
1	S_1	S_2	T_1	T_2
2	S_2	T_1	T_2	S_1
3	T_1	T_2	S_1	S_2
4	T_2	S_1	S_2	T_1

La preparación estándar se administró en dosis de 0,001UI/ml y 0,003 UI/ml. Se prepararon dosis equivalentes de las preparaciones *T b*asándose en una potencia supuesta de 10 UI/ml. Cada uno de los cuatro tratamientos se aplicó una vez en cada fila y una vez en cada columna.

Tabla 5.1.3.-II Medida de contracción del útero en milímetros.

	Columnas				***Media de las filas* (*R*)**
Filas	**1**	**2**	**3**	**4**	
1	26	31	20	33	**27,50**
2	31,5	18	29	23	**25,375**
3	17	22	16	28	**20,75**
4	24	14	24	16	**19,50**
***Media de las columnas* (*C*)**	**24,625**	**21,25**	**22,25**	**25,00**	

Tabla 5.1.3.-III Medias de los tratamientos

	Estándar S		***Preparación T***	
	S_1	S_2	T_1	T_2
Media	19,75	28,625	17,75	27,00

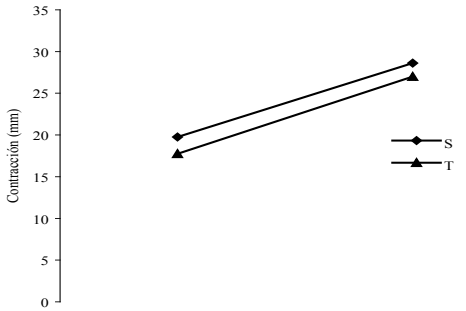


Figura 5.1.3.- I

Las fórmulas de las *Tablas 3.2.3.-I* y *3.2.3.-II* proporcionan:

$P_S = 48{,}375$ $\quad L_S = 4{,}4375$

$P_T = 44{,}75$ $\quad L_T = 4{,}625$

$H_P = 2$ $\quad H_L = \frac{48}{6} = 8$

$K = 8672{,}265625$

El análisis de varianza ya puede ser completado con las fórmulas de las *Tablas 3.2.3.-III* y *3.2.3.-IV*. El resultado se muestra en la *Tabla 5.1.3.-IV*.

Tabla 5.1.3.-IV Análisis de varianza

Fuente de variación	***Grado de libertad***	***Suma de cuadrados***	***Cuadrado medio***	***Razón F***	***Probabilidad***
Preparaciones	1	13,1406	13,1406		
Regresión	1	328,5156	328,5156	512,8248	0,0000
No paralelismo	1	0,1406	0,1406	0,2195	0,6560
Tratamientos	3	341,7969	113,9323		
Filas	3	171,5469	57,1823	89,2637	0,0000
Columnas	3	39,7969	13,2656	20,7081	0,0014
Error Residual	6	3,8436	0,6406		
Total	15	556,9843	37,1323		

El análisis de varianza demostró diferencias significativas entre las filas y las columnas. Esto indica el aumento de precisión conseguido mediante el uso de un diseño cuadrado latino en lugar de un diseño completamente aleatorizado.

La regresión altamente significativa y el desvío del paralelismo no significativo, confirman que el ensayo es válido y se calcula la potencia aplicando las fórmulas de la *Sección 3.2.5*.

$$b = \frac{8 \times (4{,}4375 + 4{,}625)}{\ln 3 \times 4 \times 2} = 8{,}2491$$

El ln de la relación de potencia para la preparación *T* es

$$M_T^{'} = \frac{44{,}75 - 48{,}375}{2 \times 8{,}2491} = -0{,}2197$$

$$C = \frac{328{,}5156}{328{,}5156 - 0{,}6406 \times 5{,}9878} = 1{,}0118$$

$$V = \frac{328{,}5156}{4 \times 2 \times (8{,}2491)^2} = 0{,}6035$$

y ln de los límites de confianza para la preparación *T* es:

$$1{,}0118(-0{,}2197) \pm \sqrt{(1{,}0118 - 1) \times (1{,}0118 \times (-0{,}2197)^2 + 2 \times 0{,}6035)} = -0{,}2223 \pm 0{,}1217$$

Tomando antilogaritmos se calcula una relación de potencias de 0,8028 con límites de confianza, del 95 por ciento, de 0,7089 y 0,9043. Multiplicando por la potencia asumida de 10 UI/ml resulta una potencia de 8,028 UI/ml con límites de confianza de 7,089 y 9,043 UI/ml.

5.2 Modelo de relación de pendientes

5.2.1 Ensayo completamente aleatorizado con diseño (2× 3 +1)

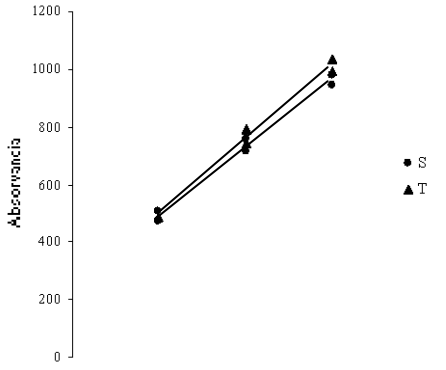
Ensayo de Factor VIII

Se lleva a cabo un ensayo cromogénico de actividad de concentrado de factor VIII. Se preparan tres diluciones independientes en progresión aritmética, por duplicado, tanto para el estándar como para la preparación desconocida. Además se prepara un blanco. Se realizan dos réplicas de cada dilución y se usa el promedio de estas como respuesta a cada tratamiento. Potencia asumida 250 UI/vial.

Tabla 5.2.1-I Promedio de Absorbancias

	Blanco	***Estándar (S)***			***Desconocido (T)***		
		S_1	**S_2**	**S_3**	**T_1**	**T_2**	**T_3**
		mUI/ml			***mUI/ml***		
		1,5	**3,0**	**4,5**	**1,5**	**3,0**	**4,5**
	241	474	714	946	487	790	992
	245	509	754	976	486	745	1034
Media	**243,0**	**491,5**	**734,0**	**961,0**	**486,5**	**767,5**	**1013,0**

Figura 5.2.1-I



Las fórmulas de las *Tablas 3.3.3.1.-I* y *3.3.3.1.-II* proporcionan

$P_S = 2186{,}50$	$P_T = 2267$
$L_S = 4842{,}50$	$L_T = 5060{,}5$
$a_S = 1556{,}00$	$a_T = 1375$
$b_S = 939{,}00$	$b_T = 1053$
$G_S = 1703849{,}25$	$G_T = 1851907{,}5$
$J_S = 40{,}042$	$J_T = 210{,}042$
$H_B = 0{,}923076923$	$H_I = 0{,}023809523$
$a = 244{,}25$	$K = 6302032{,}071$

El análisis de varianza ya puede ser completado con las fórmulas de las *Tablas 3.3.3.1.-III* y *3.3.3.1.-IV*. El resultado se muestra en la *Tabla 5.2.1.-II.*

Tablas 5.2.1.-II Análisis de varianza

Fuente de variación	***Grado de libertad***	***Suma de cuadrados***	***Cuadrado medio***	***Razón F***	***Probabilidad***
Regresión	2	926687,8068	463343,9034	861,3460	0,0000
Blancos	1	1,4423	1,4423	0,0027	0,9600
Intersección	1	390,0119	390,0119	0,7250	0,4227
No linealidad	2	500,1680	250,0840	0,4649	0,6463
Tratamientos	6	927579,4290	154596,5715		
Error Residual	7	3765,5000	537,938		
Total	13	931344,9290			

Una regresión altamente significativa y desviaciones no significativas de linealidad e intersección indica que puede ser calculada la potencia. Además se observa el cumplimiento de blancos.

Aplicando las fórmulas de la *Sección 3.3.5* se obtiene:

$$a' = 243{,}5769$$

Pendiente del estándar

$$b_S' = \frac{6 \times 4842{,}50 - 9 \times 4 \times 243{,}5769}{2 \times 27 + 9 \times 3 + 3} = 241{,}5028$$

Pendiente de la preparación desconocida

$$b_T' = \frac{6 \times 5060{,}50 - 9 \times 4 \times 243{,}5769}{2 \times 27 + 9 \times 3 + 3} = 257{,}0742$$

La relación de potencia para la preparación *T* es

$$R_T' = 1{,}0645$$

$$C = \frac{241{,}5028^2}{241{,}5028^2 - 537{,}938 \times 2{,}3646^2 \times 0{,}0852} = 1{,}0044$$

$$K' = (1{,}0044 - 1)0{,}58064 = 0{,}0025$$

Los límites de confianza se calculan a partir de

$$1{,}0044 \times 1{,}0645 - 0{,}0025 \pm \sqrt{(1{,}0044 - 1)(1{,}1381 + 1) + 0{,}0025(0{,}0025 - 2{,}1383)} = 1{,}0666 \pm 0{,}0629$$

Se calcula una relación de potencias de 1,0645 con límites de confianza, del 95 por ciento, de 1,0037 y 1,1295. Como la preparación analizada tiene una potencia asumida de 250 UI/vial, por lo tanto su potencia estimada es de 266,12 UI/vial con límites de confianza de 250,92 UI/vial y 282,37 UI/vial. Nótese que a diferencia del análisis de líneas paralelas no se calculan los antilogaritmos.

5.2.2 Ensayo completamente aleatorizado con diseño (3× 4)

Un ensayo in vitro de vacunas de influenza

El contenido en antígeno hemaglutinina (HA) de dos vacunas de influenza es determinado por inmunodifusión radial simple. Ambas tienen una potencia en rótulo de 15 μg HA por dosis, que equivale a un contenido de 30 μg HA/ml. El estándar tiene un contenido asignado de 39 μg HA/ml.

Se aplica el estándar y las dos vacunas problema en cuatro concentraciones duplicadas las cuales están preparadas sobre la base de los contenidos asignado y declarado respectivamente. Cuando se establece el equilibrio entre los reactantes, externo e interno, se mide la zona del área de precipitación anular. Los resultados se muestran en la *Tabla 5.2.2.-I*.

Tabla 5.2.2.1 Zona de precipitación area (*mm* ^{2})

Concentración (μg/ml)	***Estándar***		***Preparación T***		***Preparación U***	
	I	II	I	II	I	II
7,5	18,0	18,0	15,1	16,8	15,4	15,7
15,0	22,8	24,5	23,1	24,2	20,2	18,6
22,5	30,4	30,4	28,9	27,4	24,2	23,1
30,0	35,7	36,6	34,4	37,8	27,4	27,0

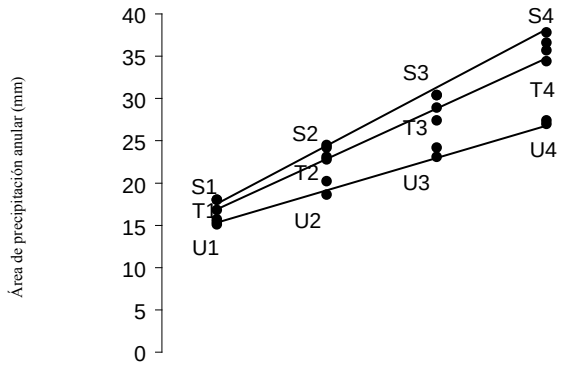


Figura 5.2.2.-I

Una representación gráfica de los datos no muestra hechos inusuales. Aplicando las fórmulas de las *Tablas 3.3.3.1.-I* y *3.3.3.1.-II* se obtiene:

$P_S = 108{,}2$	$P_T = 103{,}85$	$P_U = 85{,}8$
$L_S = 301{,}1$	$L_T = 292{,}1$	$L_U = 234{,}1$
$a_S = 141{,}0$	$a_T = 116{,}7$	$a_U = 139{,}8$
$b_S = 61{,}2$	$b_T = 64{,}95$	$b_U = 39{,}2$
$G_S = 3114{,}3$	$G_T = 2909{,}4$	$G_U = 1917{,}3$
$J_S = 0{,}223$	$J_T = 2{,}227$	$J_U = 0{,}083$
$H_I = 0{,}00925926$	$a' = 11{,}0416667$	$K = 14785{,}7704$

y el análisis de varianza se completa con las fórmulas de las *Tablas 3.3.3.1.-III* y *3.3.3.1.-IV*. Esto se muestra en la *Tabla 5.2.2.-II*.

Tabla 5.2.2.-II Análisis de varianza

Fuente de variación	***Grado de libertad***	***Suma de cuadrados***	***Cuadrado medio***	***Razón F***	***Probabilidad***
Regresión	3	1087,66519	362,55065	339,497525	0,0000
Intersección	2	3,47388889	1,7369444	1,62647939	0,2371
No linealidad	6	5,0655	0,84425	0,79055794	0,5943
Tratamientos	11	1096,20458			
Error Residual	12	12,815	1,06791667		
Total	23	1109,01958			

Una regresión altamente significativa y desviaciones no significativa de linealidad e intersección indica que puede ser calculada la potencia.

Pendiente del estándar $$b_S' = \frac{6 \times 301{,}1 - 60 \times 11{,}0416667}{180} = 6{,}35611$$

Pendiente *T* es $$b_T' = \frac{6 \times 292{,}1 - 60 \times 11{,}0416667}{180} = 6{,}05611$$

Pendiente de *U* es $$b_U' = \frac{6 \times 234{,}1 - 60 \times 11{,}0416667}{180} = 4{,}12277$$

Esto proporciona una relación de potencias de 0,95280 para la vacuna *T* y 0,64863 para la vacuna *U*.

$$C = \frac{6{,}35611^2}{6{,}35611^2 - 1{,}06791667 \times 2{,}179^2 \times 0{,}4444} = 1{,}00561$$

$$K' = 0{,}00560842 \times 0{,}625 = 0{,}0035$$

Y los límites de confianza se determinan con la fórmula *3.3.5.1.-4*

Para la vacuna *T* son: $$0{,}95464 \pm \sqrt{0{,}00561 \times 1{,}91292 + 0{,}0035 \times (-1{,}91279)} = 0{,}95464 \pm 0{,}06343$$

Para la vacuna *U* son: $$0{,}64877 \pm \sqrt{0{,}00561 \times 1{,}42308 + 0{,}0035 \times (-1{,}30104)} = 0{,}64877 \pm 0{,}05856$$

El contenido HA por dosis se puede determinar multiplicando las razones de potencias y límites de confianza por la potencia asumida, 15 µg/dosis. Los resultados están dados en la *Tabla 5.2.2.-III*

Tabla 5.2.2.-III Estimación de potencia HA (µg/dosis)

	Límite inferior	***Potencia estimada***	***Límite superior***
Vacuna T	13,4	14,3	15,3
Vacuna U	8,9	9,7	10,6

6 COMBINACIÓN DE RESULTADOS DE ENSAYOS

6.1 Introducción

Con frecuencia es necesario la repetición de ensayos independientes y la combinación de sus resultados para cumplir los requisitos de esta Farmacopea. La cuestión que surge es, si es apropiado combinar los resultados de tales ensayos y si es así, de qué forma debe hacerse.

Dos ensayos pueden ser considerados mutuamente independientes cuando la ejecución de uno no afecta las probabilidades de los posibles resultados del otro. Esto implica que los errores aleatorios en la totalidad de los factores esenciales que influyen sobre el resultado (por ejemplo, diluciones del estándar y de la preparación que se va a examinar, la sensibilidad del indicador biológico) en un ensayo, tienen que ser independientes de los correspondientes errores aleatorios en el otro. Los ensayos, en días sucesivos, usando las diluciones originales y retenidas del estándar no son ensayos independientes.

Existen diversos métodos para combinar los resultados de ensayos independientes, cuanto más aceptable sea teóricamente el método más difícil será de aplicar. A continuación se describen tres (*6.2.3* ó *6.2.4* y *6.3*) métodos simples de aproximación, se pueden utilizar otros, siempre que se cumplan las condiciones necesarias.

Cuando se combinan potencias de ensayos provenientes de modelo de líneas paralelas las mismas deben ser transformadas a logaritmos (M) y cuando provienen de ensayos de modelo relación de pendientes, las potencias (R) se usan como tal. Ya que los modelos de líneas paralelas son más comunes que los basados en el modelo de relación de pendientes, el símbolo *M* que denota el logaritmo de la potencia se usa en las fórmulas de esta sección. En ensayos de relación de pendientes se usan las mismas formulas y R, pero corregidas por la potencia asumida en cada ensayo previo a la combinación..

6.2 Combinación ponderada de resultados de ensayos

Este método se puede usar siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

1 - las estimaciones de la potencia derivan de ensayos independientes;

2 - para cada ensayo, *C* está próximo a 1 (inferior a 1,1);

3 - el número de grados de libertad de los errores residuales individuales no es inferior a 6, pero preferiblemente es mayor de 15.

4 - las potencias individuales estimadas forman un conjunto homogéneo (ver *Sección 6.2.2*).

Cuando estas condiciones no se cumplen esté método no se puede aplicar. Entonces puede utilizarse el método descripto en la *Sección 6.3* para obtener la mejor estimación de la potencia media.

6.2.1 Cálculo de los coeficientes de ponderación

Se asume que los resultados de cada uno de los *n'* ensayos han sido analizados para dar *n'* valores de *M* con los límites de confianza asociados. Para cada ensayo se obtiene la longitud del intervalo de confianza logarítmico, *L*, restando el límite inferior del superior. El peso *W* para cada valor de *M* se calcula a partir de la ecuación *6.2.2.-I*, en la que *t* tiene el mismo valor que el utilizado para el cálculo de los límites de confianza.

$$W = \frac{4t^2}{L^2} \qquad (6.2.1.\text{-}I)$$

6.2.2 Homogeneidad de las estimaciones de potencia

Sumando, de todos los ensayos, la desviación de cada M con respecto a la media ponderada ($\overline{M}$) elevada al cuadrado y multiplicada por el peso (*6.2.2.1*) se obtiene un estadístico, χ^2 (ver *Tabla 7.3*) y que se puede utilizar para probar la homogeneidad de un conjunto de ln de potencias estimadas:

$$\chi^2 = \sum_n W(M - \overline{M})^2 \qquad (6.2.2.\text{-}1)$$

donde $\overline{M} = \frac{\sum WM}{\sum W}$

Si el χ^2 calculado es inferior al valor tabulado correspondiente con (n'–1) grados de libertad las potencias son homogéneas y tendrán sentido calcular la potencia media y los límites de confianza por el método de la *Sección 6.2.3*.

Si el valor calculado de este estadístico es superior al valor tabulado, las potencias son heterogéneas. Esto significa que la variación entre las estimaciones individuales de *M* es mayor que la que se podría predecir a partir de las estimaciones de los límites de confianza, esto es, que existe una variabilidad significativa entre los ensayos. Bajo estas circunstancias la condición 4 no se cumple y las ecuaciones de la *Sección 6.2.3* ya no se pueden aplicar. En cambio se pueden usar las fórmulas de la *Sección 6.2.4*.

6.2.3 Cálculo de la media ponderada y límites de confianza

Se forman los productos *WM* para cada ensayo y su suma se divide por el peso total de todos los ensayos para dar el logaritmo de la potencia media ponderada.

$$\overline{M} = \frac{\sum WM}{\sum W} \qquad (6.2.3.\text{-}1)$$

El error estándar del ln (potencia media) se calcula como la raíz cuadrada de la inversa del peso total:

$$S_{\overline{M}} = \sqrt{\frac{1}{\sum W}} \qquad (6.2.3.\text{-}2)$$

y se obtienen los límites de confianza aproximados a partir de los antilogaritmos de los valores dados por

$$\overline{M} \pm t \; s_{\overline{M}} \qquad (6.2.3.\text{-}3)$$

donde el número de grados de libertad de *t* es igual a la suma del número de grados de libertad de los cuadrados medios del error de los ensayos individuales.

6.2.4 Media ponderada y límites de confianza basados en la variación intra e inter ensayo

Cuando los resultados de varios ensayos repetidos se combinan, el valor χ^2 puede ser significativo. Se considera entonces que la variación observada tiene dos componentes:

- La variación intra ensayo $s^2_{\overline{M}} = \frac{1}{W}$

- La variación inter ensayo $s^2_{\overline{M}} = \frac{\sum (M - \overline{M})^2}{n'(n'-1)}$

donde $\overline{M}$ es la media no ponderada. La primera componente varía de ensayo a ensayo mientras que la última es común para todo *M*.

Para cada *M* se calcula entonces un coeficiente de ponderación como sigue

$$W' = \frac{1}{s^2_M + s^2_{\overline{M}}}$$

que sustituye a *W* en la *Sección 6.2.3* donde *t* se considera que es aproximadamente 2.

6.3 ***Combinación no ponderada de resultados de ensayos***

Para combinar las *n'* estimaciones de *M* a partir de *n*' ensayos de forma más sencilla se calcula la $\overline{M}$ y se obtiene una estimación de su desviación estándar calculando

$$s^2_{\overline{M}} = \frac{\sum (M - \overline{M})^2}{n'(n'-1)} \qquad (6.3.\text{-}1)$$

y los límites son: $\overline{M} \pm t \; s_{\overline{M}}$ (*6.3.-2*)

Donde *t* tiene (*n*'-1) grados de libertad. El número *n*' de estimaciones de *M* normalmente es pequeño, y por tanto, el valor de *t* es bastante grande.

6.4 Ejemplo de potencia media ponderada y límites de confianza de ensayos de líneas paralelas

En *la Tabla 6.4.-I* se recogen seis estimaciones independientes de la potencia de la misma preparación, junto con sus límites de confianza del 95 % y el número de grados de libertad de sus varianzas del error. Cumplen las condiciones 1, 2 y 3 de la *Sección 6.2*. Los ln de las potencias y los pesos se calculan como se describe en la *Sección 6.2*.

Tabla 6.4.-I Potencia estimada e intervalos de confianza de seis ensayos independientes

Potencia estimada (UI/vial)	***Límite inferior (UI/vial)***	***Límite superior (UI/vial)***	***Grados de libertad***	***ln Potencia M***	***Peso W***
18,367	17,755	19,002	20	9,8183	3777,7
18,003	17,415	18,610	20	9,7983	3951,5
18,064	17,319	18,838	20	9,8017	2462,5
17,832	17,253	18,429	20	9,7887	4003,0
18,635	17,959	19,339	20	9,8328	3175,6
18,269	17,722	18,834	20	9,8130	4699,5

Se evalúa la homogeneidad de las potencias estimadas con la fórmula *6.2.2.-1* la cual da un χ^2 de 4,42 con 5 grados de libertad. Esto es, no significativo (p = 0,49) por lo que se cumplen todas las condiciones.

La potencia media ponderada se calcula con la fórmula *6.2.3.-1*, resulta 9,8085.

La fórmula *6.2.3.-2* da una desviación estándar de 0,00673 y límites de confianza, del 95 %, de 9,7951 y 9,8218 que se calculan con la fórmula *6.2.3.-3* donde *t* tiene 120 grados de libertad.

Al tomar los antilogaritmos se obtiene una potencia de 18187 IU/vial con límites de confianza de 17946 UI/vial y 18431 IU/vial.

6.5 ***Ejemplo de potencia media ponderada y límites de confianza de ensayos de relación de pendientes con igual potencia asumida***

En la *Tabla 6.5.-I* se especifican seis estimaciones independientes de potencia de la misma preparación, con igual potencia asumida (250UI/vial), la potencia corregida por potencia asumida con sus límites de confianza del 95% y el número de grados de libertad de la varianza del error. Cumplen las condiciones 1,2 y 3 de la *Sección 6.2*.

Tabla 6.5.-I Potencia estimada y peso de cuatro ensayos independientes

Potencia estimada R	***Potencia corregida por potencia asumida R'***	***Grados de libertad***	***Peso W***
260,768	1,043072	7	492,826
260,656	1,042624	7	315,215
250,792	1,003168	7	423,044
260,068	1,040272	7	566,024
270,000	1,080000	7	320,000
240,800	0,963200	7	350,100

Se evalúa la homogeneidad de las potencias estimadas con la formula *6.2.2.-1* la cual da un χ^2 de 2,8584 con 5 grados de libertad, esto es "no significativo", el χ^2 de tabla es 11,070 por lo que se cumplen todas las condiciones.

La potencia media ponderada se calcula con la fórmula *6.2.3.-1*, multiplicada por la potencia supuesta resulta ser 257,25 UI/ vial.

La fórmula *6.2.3.2* da una desviación estándar de 0,02013 y los limites de confianza, del 95%, obtenidos por la formula *6.2.3.3*, donde t tiene 42 grados de libertad, dan un resultado de 247,08 UI/vial y 267,41 UI/ vial cuando se multiplican por la potencia supuesta.

7 TABLAS

Las tablas de esta sección proporcionan un listado de valores críticos para los números de grados de libertad más frecuentes. Si un valor crítico no está en la lista debe buscarse en tablas más completas. Muchos programas de ordenador incluyen funciones estadísticas y se recomienda su uso en lugar de las tablas de esta sección.

7.1 Distribución F

Si un valor observado es mayor que el valor de la tabla se considera que es significativo (líneas superiores, p=0,05) y muy significativo (líneas inferiores, p=0,01). gl 1 es el número de grados de libertad del numerador y gl 2 es el número de grados de libertad del denominador.

Tabla 7.1 Niveles de significación de la relación de varianzas (*F*)

gl 1→ / gl 2↓	1	2	3	4	5	6	8	10	12	15	20	∞
10	4,965 10,044	4,103 7,559	3,708 6,552	3,478 5,994	3,326 5,636	3,217 5,386	3,072 5,057	2,978 4,849	2,913 4,706	2,845 4,558	2,774 4,405	2,538 3,909
12	4,747 9,330	3,885 6,927	3,490 5,953	3,259 5,412	3,106 5,064	2,996 4,821	2,849 4,499	2,753 4,296	2,687 4,155	2,617 4,010	2,544 3,858	2,296 3,361
15	4,543 8,683	3,682 6,359	3,287 5,417	3,056 4,893	2,901 4,556	2,790 4,318	2,641 4,004	2,544 3,805	2,475 3,666	2,403 3,522	2,328 3,372	2,066 2,868
20	4,351 8,096	3,493 5,849	3,098 4,938	2,866 4,431	2,711 4,103	2,599 3,871	2,447 3,564	2,348 3,368	2,278 3,231	2,203 3,088	2,124 2,938	1,843 2,421
25	4,242 7,770	3,385 5,568	2,991 4,675	2,759 4,177	2,603 3,855	2,490 3,627	2,337 3,324	2,236 3,129	2,165 2,993	2,089 2,850	2,007 2,699	1,711 2,169
30	4,171 7,562	3,316 5,390	2,922 4,510	2,690 4,018	2,534 3,699	2,421 3,473	2,266 3,173	2,165 2,979	2,092 2,843	2,015 2,700	1,932 2,549	1,622 2,006
50	4,034 7,171	3,183 5,057	2,790 4,199	2,557 3,720	2,400 3,408	2,286 3,186	2,130 2,890	2,026 2,698	1,952 2,563	1,871 2,419	1,784 2,265	1,438 1,683
∞	3,841 6,635	2,996 4,605	2,605 3,782	2,372 3,319	2,214 3,017	2,099 2,802	1,938 2,511	1,831 2,321	1,752 2,185	1,666 2,039	1,571 1,878	1,000 1,000

7.2 Distribución t

Si un valor observado es superior al tabulado, se considera que es significativo (p = 0,05) y muy significativo (p = 0,01).

Tabla 7.2 Niveles de significación de t (*valores absolutos*)

gl	***p* =0,05**	***p* =0,01**	***gl***	***p* =0,05**	***p* =0,01**
1	12,706	63,656	22	2,074	2,819
2	4,303	9,925	24	2,064	2,797
3	3,182	5,841	26	2,056	2,779
4	2,776	4,604	28	2,048	2,763
5	2,571	4,032	30	2,042	2,750
6	2,447	3,707	35	2,030	2,724
7	2,365	3,499	40	2,021	2,704
8	2,306	3,355	45	2,014	2,690
9	2,262	3,250	50	2,009	2,678
10	2,228	3,169	60	2,000	2,660
12	2,179	3,055	70	1,994	2,648
14	2,145	2,977	80	1,990	2,639
16	2,120	2,921	90	1,987	2,632
18	2,101	2,878	100	1,984	2,626
20	2,086	2,845	∞	1,960	2,576

7.3 Distribución χ^2

Si un valor observado es superior a uno tabulado, se considera que es significativo (p=0,05) y muy significativo (p=0,01).

Tabla 7.3 Niveles de significación de χ^2

gl	***p* =0,05**	***p* =0,01**	***gl***	***p* =0,05**	***p* =0,01**
1	3,841	6,635	11	19,675	24,725
2	5,991	9,210	12	21,026	26,217
3	7,815	11,345	13	22,362	27,688
4	9,488	13,277	14	23,685	29,141
5	11,070	15,086	15	24,996	30,578
6	12,592	16,812	16	26,296	32,000
7	14,067	18,475	20	31,410	37,566
8	15,507	20,090	25	37,652	44,314
9	16,919	21,666	30	43,773	50,892
10	18,307	23,209	40	55,758	63,691

7.4 Distribución Φ (*Distribución normal estándar acumulada*)

x	**Φ**	**x**	**Φ**	**x**	**Φ**
0,00	0,500	1,00	0,841	2,00	0,977
0,05	0,520	1,05	0,853	2,05	0,980
0,10	0,540	1,10	0,864	2,10	0,982
0,15	0,560	1,15	0,875	2,15	0,984
0,20	0,579	1,20	0,885	2,20	0,986
0,25	0,599	1,25	0,894	2,25	0,988
0,30	0,618	1,30	0,903	2,30	0,989
0,35	0,637	1,35	0,911	2,35	0,991
0,40	0,655	1,40	0,919	2,40	0,992
0,45	0,674	1,45	0,926	2,45	0,993
0,50	0,691	1,50	0,933	2,50	0,994
0,55	0,709	1,55	0,939	2,55	0,995
0,60	0,726	1,60	0,945	2,60	0,995
0,65	0,742	1,65	0,951	2,65	0,996
0,70	0,758	1,70	0,955	2,70	0,997
0,75	0,773	1,75	0,960	2,75	0,997
0,80	0,788	1,80	0,964	2,80	0,997
0,85	0,802	1,85	0,968	2,85	0,998
0,90	0,816	1,90	0,971	2,90	0,998
0,95	0,829	1,95	0,974	2,95	0,998

El valor Φ para valores negativos de x se calcula en la tabla como

$1 - \Phi (- x)$

8 GLOSARIO DE SÍMBOLOS

a = Intersección de la línea de regresión de la respuesta con respecto a las dosis o al ln (dosis)

b = Pendiente de la línea de regresión de la respuesta con respecto a las dosis o al ln (dosis)

d = Número de niveles de dosis para cada preparación (excepto el blanco de los ensayos de relación de pendientes)

e = Base de los logaritmos naturales (= 2,71828182845905...)

g = Estadístico usado en el teorema de Fieller: $g = C - 1/C$

gl= Grados de libertad

h = Número de preparaciones de un ensayo incluyendo la preparación estándar

m = Potencia estimada obtenida como una relación de efectos en los modelos lineales generales

n = Número de replicados de cada tratamiento

n' = Numero de ensayos

p = Probabilidad de que un estadístico dado sea mayor que el valor observado. También se utiliza como el cociente r/n en análisis de probitos

r = Número de unidades con respuesta por grupo de tratamiento, en ensayos que dependen de respuestas cuantales

s = Estimación de la desviación estándar = $\sqrt{s^2}$

s^2 = Estimación de la varianza residual dada por el cuadrado medio del error en análisis de varianza

t = Estadístico de Student (*Tabla 7.2*.)

v_{11}, v_{12}, v_{22} = Multiplicadores de (co)varianza para el numerador y el denominador del cociente m en el teorema de Fieller

w = Coeficiente de ponderación

x = ln (dosis)

y = Respuesta individual o respuesta transformada

A = Potencias asumidas de las preparaciones a ensayar cuando se preparan las dosis

B = Respuesta media de los blancos en los ensayos de relación de pendiente

C = Estadístico usado en el cálculo de intervalos de confianza: C=1/1 – g

C_1,....., C_n = Respuesta media de cada columna en el diseño de cuadrado latino

D_1, D_2 = Respuesta media a tiempo 1 o a tiempo 2 en el diseño cruzado doble

F = Relación de dos estimaciones independientes de varianza que sigue una distribución F (*Tabla 7.1*)

G_S, G_T,.. = Valores de los tratamientos utilizados en el análisis de varianza para ensayos de relación de pendientes

H_P, H_L = Multiplicadores utilizados en el análisis de varianza para ensayos de líneas paralelas

H_B, H_I = Multiplicadores utilizados en el análisis de varianza para ensayos de relación de pendientes

I = En ensayos de líneas paralelas, ln del cociente entre dosis adyacentes. En ensayos de relación de pendientes, el intervalo entre dosis adyacentes

J_S, J_T = Valores de linealidad utilizados en el análisis de varianza para ensayos de relación de pendientes

K = Término de corrección usado en el cálculo de sumas de cuadrados en el análisis de varianzas

L = Logaritmo de la longitud del intervalo de confianza

L_S, L_T,... = Contrastes lineales del estándar y de las preparaciones ensayadas

M' = Logaritmo de la relación de potencia para una preparación ensayadas

N = Número total de tratamientos en el ensayo (= dh)

P_S, P_T,... = Suma de las respuestas medias del estándar (S1 +S2 + …..Sd) y de cada preparación ensayada

R = Potencia estimada para una preparación ensayada

R' = Relación de potencia para una preparación ensayada

R_1,...,R_n = Respuesta media de cada fila l a n en un diseño de cuadrado latino o de cada bloque en un diseño de bloques aleatorizados

S = Preparación estándar

S_1,..., S_d = Respuesta media a la dosis más baja 1, hasta la más alta *d*, de la preparación estándar *S*

SC = Suma de cuadrados debida a la fuente de variación dada

T, U, V... = Preparaciones a ensayar

T_1,..., T_d = Respuesta media a la dosis más baja 1, hasta la más alta *d*, de la preparación a ensayar *T*

V = Coeficiente de varianza en el cálculo de los límites de confianza

W = Factor de ponderación en la combinación de resultados del ensayo

X = Estructura lineal o matriz del diseño usado en modelos lineales generales

Y,*Y'* = Vector que representa las respuestas (transformadas) en modelos lineales generales

Z = La primera derivada de Φ

π = 3,141592653589793238....

Φ = Función de distribución normal estándar acumulada (*Tabla 7.4*)

χ^2 = Estadístico Chi-cuadrado (*Tabla 7.3*)

Actualización total

20. ANÁLISIS TÉRMICO

Las Técnicas Termoanalíticas se basan en el calentamiento o enfriamiento de muestras a velocidades programables o en condiciones isotérmicas, dentro de rangos de temperatura y atmósferas (aire, nitrógeno, etc.) adecuados. Estos procesos, a través de las transiciones, cambios de estado, interacciones que en ellos se produjeran, etc., permiten obtener información cuali y cuantitativa sobre propiedades de las sustancias y características de las muestras, tales como: estados cristalinos y amorfos, temperatura de fusión, calor específico, pureza, estabilidad, composición y transformaciones polimórficas, composición isomérica, transiciones vítreas, sublimación, interacciones sólido – sólido, etc.. Algunas de estas propiedades contribuyen corrientemente a la identificación de sustancias.

Estas técnicas tienen las ventajas de utilizar pequeñas cantidades de muestra (del orden del miligramo) que se utilizan frecuentemente sin tratamiento previo y de poseer alta sensibilidad, precisión y exactitud.

Las técnicas de Análisis Térmico que se emplean con mayor frecuencia son: la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB), el Análisis Térmico Diferencial (ATD), el Análisis Termogravimétrico (ATG), el Análisis Termomecánico (ATM) y la Microscopía de Platina Calentable (MPC). Las propiedades medidas por estas técnicas se indican en la *Tabla 1*.

Tabla 1.

Técnica	Propiedad medida/estudiada
CDB	cambios de energía (absorción o liberación de calor)
ATD	diferencia de temperaturas entre muestra y referencia
ATG	masa (variación en el peso de la muestra)
ATM	deformación (variación en las dimensiones físicas)
MPC	cambios visuales (morfológicos o de color)

Durante los análisis, las propiedades medidas por cada método son registradas en función de la temperatura y/o el tiempo, permitiendo, para las cuatro primeras técnicas presentadas, la visualización de los barridos en gráficos cuya interpretación contribuye en gran medida a la elaboración de las conclusiones.

La información producida por los gráficos antedichos, se resume en la *Tabla 2*, excepto para el Análisis Térmico Diferencial, cuyas aplicaciones varían según las características de los aparatos.

Tabla 2.

Información	CDB	ATG	ATM
Calor específico	SI		
Temperatura de fusión	SI		en polímeros
Calor de fusión, cristalinidad	SI		
Evolución de la fusión, fracción líquida	SI		
Análisis de la composición	SI	SI	
Identificación y pureza de cristales (material no polimérico)	SI	SI	
Evaporación, desorción, secado, sublimación	SI	SI	
Polimorfismo	SI		SI
Pseudopolimorfismo	SI	SI	
Calores de transición	SI		
Transiciones polimórficas	SI		
Mesofases en cristales líquidos	SI		
Transiciones vítreas, suavizado	SI		SI
Estabilidad y descomposición térmica, pirólisis, despolimerización	SI	SI	SI
Análisis de productos de descomposición gaseosos liberados(por asociación con otros equipos)		SI	

Coeficiente de expansión lineal			SI
Comportamiento viscoelástico			SI
Compatibilidad de sustancias entre sí y de sustancias con el material de empaque	SI	SI	en polímeros
Polimerización, curado	SI		SI
Cinética de reacción	SI		SI

Dado que los resultados dependen en ciertos casos de las condiciones bajo las cuales se realizaron los ensayos, es necesario incluir en cada registro térmico una descripción completa de las mismas, entre las que se encuentran: marca y modelo del aparato, tamaño e identificación de la muestra, material, capacidad y estado del crisol empleado para contener la muestra, programa de temperaturas, composición y caudal del gas empleado, presión del sistema y sensibilidad de las determinaciones.

Calorimetría diferencial de Barrido (CDB)

La técnica se basa en mantener iguales las temperaturas de la muestra y la referencia cuando se someten ambas a procesos de calentamiento o enfriamiento (dinámicos, isotérmicos o ambos combinados). El procedimiento se realiza en un horno provisto de un sensor de alta sensibilidad, donde se ubican tanto el crisol con la muestra, como el crisol de referencia, vacío. Dado que las transiciones físicas y las reacciones químicas de las muestras van siempre acompañadas de absorciones o desprendimientos de energía adicionales a los mencionados procesos, es función del equipo medir las diferencias de flujo de calor necesarias para mantener en todo momento la misma temperatura en ambos crisoles.

Determinación de Pureza (análisis de impurezas eutécticas) -

La fusión de un compuesto cristalino puro debe producirse dentro de un intervalo de temperatura muy reducido, correspondiente a la temperatura de fusión T_0, pero la presencia de *impurezas eutécticas* (aquellas solubles en la fase líquida formada durante la fusión, pero no en la fase sólida del componente principal) expande el mencionado intervalo y produce un descenso en la temperatura de finalización de la fusión (Punto de Fusión). Las determinaciones de pureza a través de DSC se basan en la relación entre el descenso del Punto de Fusión y la cantidad de *impurezas eutécticas*, lo cual tiene su expresión matemática a través de la Ley de Van't Hoff en su forma simplificada **(1)**, que permite predecir el efecto de las impurezas sobre T_m:

$$T_m = T_0 - \frac{RT_0^2}{\Delta H_f} x_2 \frac{1}{F}$$

en la cual:

T_m = temperatura de la muestra en cualquier punto de equilibrio durante la fusión (en °K)

T_0 = temperatura de fusión del componente principal puro (en °K)

R = constante de los gases (8,134 J/°K mol)

ΔH_f = calor molar de fusión de la muestra

x_2 = fracción molar de la impureza eutéctica en la muestra completamente fundida

F = fracción fundida

Esta ecuación permite obtener parámetros de fusión tales como:

T_f, Temperatura de Fusión (Punto de Fusión), cuando F = 1

T_0, surge de la extrapolación de la función cuando $x_2 = 0$

ΔH_f, surge de la integración del área de la endoterma de fusión

y permite además calcular la Pureza Eutéctica

Pureza Eutéctica = $(1- x_2)$ 100 moles % (sobre sustancia tal cual)

En la fórmula anterior se observa que la disminución del punto de fusión es directamente proporcional a la fracción molar de la impureza.

Los resultados de estas determinaciones son suficientemente exactos cuando las impurezas no exceden aproximadamente el 1,5% en moles. Las *impurezas* de síntesis y de degradación, entre otras, guardan cierta similaridad con el producto final y generalmente no presentan problemas de solubilidad en el material fundido, siendo, en estos casos, a través de un comportamiento eutéctico, globalmente cuantificables por esta técnica

Las *impurezas no eutécticas* no son evaluables a través de CDB. Su efecto puede ser incluso el de aumentar el punto de fusión. Ejemplos de *impurezas no eutécticas* son los cristales mixtos y las soluciones sólidas.

A las sustancias que presentan simultáneamente más de un *estado polimórfico* no se les determina la pureza, a menos que se conviertan completamente en la modificación estable durante la fusión.

El análisis de pureza no debe aplicarse a muestras que funden presentando simultáneamente fenómenos de evaporación y/o descomposición.

Polimorfismo -

Las técnicas de CDB y de ATD son particularmente útiles para detectar y caracterizar el *polimorfismo* (capacidad de una molécula de formar distintas estructuras al estado sólido), dado que registran los cambios de entalpía producidos por las transformaciones sólido–sólido, las fusiones y las recristalizaciones. Esas diferentes estructuras internas que presenta gran parte de las moléculas, pueden corresponder a diferentes Puntos de Fusión, solubilidades, reactividades químicas, estabilidades, etc., lo cual puede a su vez impactar en propiedades farmacéuticas tales como velocidad de disolución y biodisponibilidad.

Polímeros -

La posibilidad de detectar y evaluar temperaturas de transiciones vítreas, fusiones, recristalizaciones, calores específicos, grado de polimerización, curado etc., le confiere a esta técnica una particular utilidad en el análisis de *polímeros*, lo cual se refleja en la utilidad que presta en el desarrollo y control de la Industria Farmacéutica.

Análisis Térmico Diferencial (ATD)

Este análisis mide la diferencia de temperatura entre la muestra en ensayo y una referencia inerte (crisol de referencia), ambas calentadas bajo las mismas condiciones, mientras que la CDB permite cuantificar las absorciones y desprendimientos de calor. Actualmente, de los análisis de ATD también pueden obtenerse resultados calorimétricos cuantificables que permiten aplicarlo también, como se ha mencionado, en áreas en las que presta especial utilidad la CDB, como las de *polimorfismo* y *.polímeros.*

Análisis termogravimétrico (ATG)

Este análisis registra el peso de la muestra en función de la temperatura o del tiempo de calentamiento, mediante el empleo de una termobalanza. Incluye programas de calentamiento dinámico, de temperatura fija (proceso isotérmico) o mezclas de ambos. Suministra más información que la pérdida por secado a una temperatura determinada, ya que detecta las temperaturas a las que se desprenden las sustancias volátiles retenidas, además de cuantificar los respectivos desprendimientos.

Muchas sustancias tienen la capacidad de formar hidratos y/o solvatos. En los primeros, el agua está presente no sólo en su superficie como humedad, sino también en el cristal. Esta propiedad, conocida como *pseudopolimorfismo*, puede conducir a complejos procesos de fusión.

A través de este análisis, especialmente cuando está combinado con CDB, es generalmente posible distinguir entre la pérdida de solvente adsorbido en la superficie, la pérdida de solvente ocluido en el cristal y las pérdidas de masa producidas por descomposición de la sustancia.

Las mediciones se llevan a cabo bajo el flujo programado de un gas apropiado. El cálculo de la pérdida porcentual G, se efectúa a través de la fórmula siguiente:

$$G\ (\%\ \text{de pérdida}) = 100\ \Delta m/m_0$$

en la cual Δm es la pérdida de masa y m_0 es el peso inicial de la muestra.

Dado que el Análisis Termogravimétrico no identifica específicamente los productos de reacción, pueden analizarse los gases desprendidos trabajando en combinación con técnicas tales como la Espectrometría de Masa o la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.

Los equipos constan de una microbalanza asociada a una fuente de calor programable. Estos difieren, principalmente, en el intervalo de masas aceptable para las muestras a analizar y las formas de detección de la temperatura y de la masa de la muestra.

Análisis Termomecánico (ATM)

Este análisis mide los cambios dimensionales (dilatación o contracción) de una muestra expuesta o no a la acción de pequeñas cargas, en función de la temperatura o el tiempo. Se utiliza fundamentalmente en polímeros, por lo cual su relevancia en la Industria Farmacéutica se basa en su aplicación a sistemas de liberación poliméricos, envases y prótesis médicas. Además de permitir la detección de transiciones vítreas, es importante en el cálculo de Coeficientes de expansión y de Conversión.

Microscopía de platina calentable

Esta técnica reúne la visualización de la muestra a través de un microscopio en paralelo a la posibilidad de programar el calentamiento y/o el enfriamiento de la misma.

Ventajas que presenta:

- visualizar, para su estudio, los procesos de fusión y cristalización.
- detectar, durante el calentamiento o el enfriamiento, procesos que generan pequeños o ningún cambio de entalpía (cambios morfológicos y de color).

- contribuir a la interpretación de señales o picos que aparecen en otras técnicas de Análisis Térmico asociados con transiciones térmicas, en particular las polimórficas.
-

- detección de cristales birrefringentes a través del uso de luz polarizada, lo cual es de especial interés en el estudio del polimorfismo utilizando la técnica de formación de “films cristalinos”.

30. CAPACIDAD NEUTRALIZANTE DE ÁCIDO

Este ensayo se emplea para la determinación de la capacidad neutralizante de ácido de aquellos medicamentos destinados a controlar los efectos de la acidez gástrica. [NOTA: todos los ensayos se realizan a 37 ± 3 °C].

Calibración del medidor de pH - Calibrar un medidor de pH empleando solución reguladora para calibración de biftalato de potasio 0,05 M y solución reguladora para calibración de tetraoxalato de potasio 0,05 M según se indica en *<250>. Determinación del pH.*

Agitador magnético - Transferir 100 ml de agua a un vaso de precipitados de 250 ml que contiene una barra de agitación magnética de 40 mm × 10 mm, recubierta con perfluorocarbono sólido y que tiene un anillo en su centro. Ajustar la velocidad de agitación a 300 ± 30 rpm cuando la barra se centra en el vaso, empleando un tacómetro óptico apropiado.

Preparación muestra -

Polvos - Transferir una porción exactamente pesada de la muestra, especificada en la monografía correspondiente, a un vaso de precipitados de 250 ml, agregar 70 ml de agua y mezclar en el *Agitador magnético* durante 1 minuto.

Sólidos efervescentes - Transferir una cantidad exactamente pesada, equivalente a la dosis mínima indicada en el rótulo, a un vaso de precipitados de 250 ml, agregar 10 ml de agua y agitar rotando suavemente el vaso de precipitados hasta que la efervescencia termine. Agregar otros 10 ml de agua y agitar por rotación. Lavar las paredes del vaso con 50 ml de agua y mezclar en el *Agitador magnético* durante 1 minuto.

Suspensiones y otras formas líquidas - Homogeneizar el contenido del envase y determinar la densidad. Transferir una cantidad exactamente pesada de la mezcla Homogénea, equivalente a la dosis mínima indicada en el rótulo, a un vaso de precipitados de 250 ml, agregar agua hasta obtener un volumen total de aproximadamente 70 ml y mezclar en el *Agitador magnético* durante 1 minuto.

Comprimidos - Pesar no menos de veinte comprimidos y determinar el peso promedio. Moler los comprimidos a polvo fino, mezclar hasta obtener una mezcla uniforme y transferir una cantidad exactamente pesada del polvo, equivalente a la dosis mínima indicada en el rótulo, a un vaso de precipitados de 250 ml. Si se desea, se puede humedecer el polvo agregando no más de 5 ml de alcohol (neutralizado a un pH aparente de 3,5) y mezclar hasta humectar completamente. Agregar 70 ml de agua y mezclar en el *Agitador magnético* durante 1 minuto.

Cápsulas - Pesar exactamente no menos de veinte cápsulas. Retirar completamente el contenido de cada cápsula, con la ayuda de un hisopo de algodón si fuera necesario. Pesar exactamente las cápsulas vacías y determinar el peso promedio del contenido. Mezclar el polvo extraído de las cápsulas hasta obtener una mezcla uniforme y proceder según se indica en Comprimidos, comenzando donde dice "*transferir una cantidad exactamente pesada...*".

Procedimiento - Transferir 30,0 ml de ácido clorhídrico 1,0 N (SV) a la *Preparación muestra* correspondiente mientras se agita continuamente con un *Agitador magnético*. [NOTA: cuando la capacidad neutralizante de ácido de la muestra ensayada es mayor de 25 mEq, emplear 60,0 ml de ácido clorhídrico 1,0 N (SV)]. Agitar durante 15 minutos exactamente medidos luego de la adición del ácido, y en un período que no exceda los 5 minutos adicionales, titular el ácido clorhídrico en exceso con hidróxido de sodio 0,5 N (SV) hasta obtener un pH estable de 3,5 (durante 10 a 15 segundos). Calcular el número de mEq de ácido consumido y expresar el resultado en términos de miliequivalentes de ácido consumido por gramos de la sustancia ensayada. Cada mililitro de ácido clorhídrico 1,0 N equivale a 1 mEq de ácido consumido.

40. CARBONO ORGÁNICO TOTAL

Este ensayo se emplea para determinar la cantidad de carbono que forma parte de los compuestos orgánicos presentes en el agua. Normalmente, el carbono orgánico es oxidado a dióxido de carbono por combustión, por radiación ultravioleta o por la adición de agentes oxidantes. La cantidad de dióxido de carbono generada en el proceso de descomposición es medida empleando un método apropiado, como por ej., por medio de un analizador infrarrojo de gases, por medición de la conductividad eléctrica o de la resistividad. La cantidad de carbono orgánico presente en el agua puede calcularse a partir de la cantidad de dióxido de carbono medida por los métodos mencionados anteriormente.

El carbono presente en el agua puede tener dos orígenes: carbono orgánico y carbono inorgánico. La cantidad de carbono orgánico se mide por dos métodos: uno se basa en medir la cantidad de carbono total en el agua, a la cual finalmente se le resta la cantidad de carbono inorgánico; el otro se basa en extraer el carbono inorgánico del agua a ensayar, quedando finalmente una cantidad remanente de carbono que representa el carbono orgánico.

Aparato - Consta de un inyector para la muestra, un dispositivo de descomposición, un sistema de separación del dióxido de carbono, un detector y un procesador de datos o un registrador. Debe calibrarse según las instrucciones del fabricante y debe ser capaz de medir cantidades de carbono orgánico por debajo de 0,050 mg por litro.

El inyector está destinado a permitir la inyección de una cantidad específica de muestra por medio de una microjeringa u otro dispositivo de muestreo. El dispositivo de descomposición, empleado para la combustión, consta de un tubo de combustión y un horno eléctrico para calentar la muestra. Ambos dispositivos se ajustan para operar a temperaturas específicas. El dispositivo de descomposición para radiación ultravioleta o para la adición de agentes oxidantes puede constar, tanto de un compartimiento para la reacción de oxidación y una lámpara de rayos ultravioleta, o bien de la combinación de una lámpara ultravioleta con un inyector para el reactivo oxidante o de la combinación de un sistema de calentamiento con un inyector para el reactivo oxidante. El dispositivo de descomposición para ambos métodos, cuando se emplea una solución de dodecilbencenosulfonato de sodio como muestra, debe generar no menos de 0,450 mg por litro de carbono orgánico (el valor teórico del carbono orgánico total en esta solución es de 0,806 mg por litro). El sistema de separación de dióxido de carbono elimina el agua formada en el proceso de descomposición o separa dióxido de carbono de los productos de descomposición y demás componentes de la muestra. Para detectar dióxido de carbono se emplea un analizador infrarrojo de gases y un medidor de conductividad o de resistencia eléctrica, los cuales son capaces de convertir la concentración de dióxido de carbono en una señal eléctrica cuantificable. El procesador de datos calcula la concentración de carbono orgánico total en la muestra, basándose en la señal eléctrica originada por el detector.

Reactivos y soluciones estándar - [NOTA: alternativamente a los reactivos y soluciones descriptos a continuación, pueden emplearse aquellos suministrados o recomendados por el fabricante del aparato].

Agua para realizar mediciones - Se emplea para preparar las soluciones estándar, las soluciones del reactivo oxidante o para lavar el equipo. La cantidad de carbono orgánico, cuando se recolecta dentro del envase de muestra, no debe ser mayor de 0,250 mg por litro.

Solución estándar de biftalato de potasio - La concentración de esta solución es determinada según las especificaciones del fabricante del aparato. Secar el biftalato de potasio a 105 °C durante 4 horas y dejar enfriar en un desecador con gel de sílice. Pesar exactamente la cantidad especificada de biftalato de potasio seco y disolver en *Agua para realizar mediciones*.

Solución estándar para medir carbono inorgánico - La concentración de esta solución es determinada según las indicaciones del fabricante del aparato. Secar bicarbonato de sodio en un desecador con ácido sulfúrico durante no menos de 18 horas. Secar, separadamente, carbonato de sodio entre 500 y 600 °C durante 30 minutos y dejarlo enfriar en un desecador con gel de sílice. Pesar exactamente las cantidades especificadas de los compuestos de modo que la relación de su contenido de carbono sea (1:1) y disolver en *Agua para realizar mediciones*.

Reactivo oxidante - Disolver la cantidad especificada de persulfato de potasio u otra sustancia que se pueda emplear con el mismo propósito, en *Agua para realizar mediciones*, para lograr la concentración sugerida para el aparato.

Gas para eliminar el carbono inorgánico o gas transportador - Si fuera necesario, emplear para dicho propósito nitrógeno, oxígeno u otros gases.

Acido para eliminar el carbono inorgánico - Acido clorhídrico diluido, ácido fosfórico o cualquier otro ácido que se pueda emplear para dicho propósito, en suficiente cantidad de *Agua para realizar mediciones*, para obtener la concentración especificada por el fabricante del aparato.

Procedimiento - Emplear el método, analítico apropiado según el aparato. Sumergir el recipiente para la muestra, antes de ser empleado en una mezcla de peróxido de hidrógeno al 30 % y ácido nítrico diluido (1:1), lavando finalmente con *Agua para realizar mediciones*. Lavar la microjeringa con una mezcla constituida por una solución de hidróxido de sodio (1 en 20) y etanol anhidro (1:1) o ácido clorhídrico diluido (1 en 4), lavando finalmente con *Agua para realizar mediciones.*

Calibrar el aparato con la *Solución estándar de biftalato de potasio* o la recomendada por el fabricante del aparato, emplear el procedimiento sugerido por el fabricante.

Es recomendable que el aparato se instale en la línea de producción del agua a ensayar. De no ser así, llevar a cabo este ensayo en un área libre de solventes orgánico u otras sustancias que afecten el resultado del ensayo. Realizar las mediciones inmediatamente después de la recolección de la muestra.

MEDICIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO POR SUSTRACCIÓN DEL CARBONO INORGÁNICO DEL CARBONO TOTAL

De acuerdo con los procedimientos del ensayo establecidos por el fabricante del aparato, inyectar en el dispositivo de inyección un volumen de muestra apropiado en relación con la cantidad de carbono a determinar y descomponer el carbono orgánico e inorgánico presentes en la muestra. Detectar el dióxido de carbono generado y calcular la cantidad de carbono total, emplear para ello un procesador de datos o un registrador. Determinar exclusivamente la cantidad de carbono inorgánico del mismo modo en que se realizó la determinación de carbono total, modificando la configuración del aparato si fuera necesario. La cantidad de carbono orgánico se obtiene restando la cantidad de carbono inorgánico de la cantidad de carbono total.

MEDICIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN DEL CARBONO INORGÁNICO

Extraer el carbono inorgánico de la muestra por adición de *Ácido para eliminar el carbono inorgánico* seguido por el burbujeo del *Gas transportador* (como por ej., nitrógeno) si fuera necesario. De acuerdo con los procedimientos del ensayo establecidos por el fabricante del aparato, inyectar en el dispositivo de inyección un volumen de muestra apropiado en relación con la cantidad de carbono a determinar y descomponer la muestra. Detectar el dióxido de carbono generado por medio del detector y calcular la cantidad de carbono orgánico, empleando un procesador de datos o un registrador.

Para el caso de los aparatos que directamente extraen el carbono inorgánico, inyectar primero en el dispositivo de inyección un volumen de muestra apropiado en relación con la cantidad de carbono a determinar, de acuerdo con los procedimientos del ensayo establecidos por el fabricante del aparato. Extraer de la muestra el carbono inorgánico por adición de *Ácido para eliminar el carbono inorgánico* en el dispositivo de descomposición y burbujear con *Gas transportador* para eliminar el carbono inorgánico.

Descomponer el carbono orgánico, detectar el dióxido de carbono generado y calcular la cantidad de carbono orgánico, empleando un procesador de datos o un registrador.

50. COLORANTES DE USO FARMACÉUTICO

En el presente capítulo se describen los métodos de análisis y los requisitos específicos para los colorantes sintéticos utilizados en la formulación de medicamentos. Además de los colorantes descritos en este capítulo, pueden emplearse aquellos colorantes naturales autorizados por el Código Alimentario Nacional.

Se pueden emplear sustancias agregadas exclusivamente para dar color a las preparaciones oficiales, excepto en aquellas destinadas a la administración parenteral u oftálmica. Cabe aclarar que las sustancias incorporadas a la formulación deben ser apropiadas en todos los otros aspectos (ver *Consideraciones generales*), como por ej., no tener influencia adversa sobre la eficacia terapéutica de los principios activos y no interferir con los ensayos y valoraciones, entre otros. Es recomendable no agregar colorantes a las preparaciones indicadas para tratamientos prolongados. Los medicamentos de uso oral que contengan tartrazina o eritrosina deben incluir en su prospecto una leyenda con el siguiente texto: "Este medicamento contiene tartrazina como colorante" o "Este medicamento contiene eritrosina como colorante", respectivamente.

METODOS GENERALES DE ANALISIS

Identificación cromatográfica - (ver *100. Cromatografía*).

[NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico.]

Sistema A - Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de *n*-butanol, etanol, agua y amoníaco (50:25:25:10). Sembrar las soluciones sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con celulosa de 0,1 mm de espesor. Desarrollar los cromatogramas en una cámara sin revestimiento interno y sin saturar.

Sistema B - Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de metiletilcetona, acetona, agua y amoníaco (140:60:60:1). Sembrar las soluciones sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con gel de sílice 60 de 0,2 mm de espesor. Desarrollar los cromatogramas en una cámara revestida internamente con papel de filtro y saturada durante 2 horas.

Sistema C - Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de acetonitrilo, alcohol isoamílico, agua, amoníaco y metiletilcetona (50:50:15:10:5). Sembrar las soluciones sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con gel de sílice 60 de 0,2 mm de espesor. Desarrollar los cromatogramas en una cámara sin revestimiento interno y saturada durante 20 minutos. Desarrollar la placa al menos dos veces.

Procedimiento - Preparar una *Solución muestra* y una *Solución estándar* que contengan aproximadamente 1 mg por ml en metanol. Aplicar por separado 10 µl de cada una de las soluciones y desarrollar los cromatograrnas.

Identificación espectrofotométrica - (ver *470. Espectrofotometría ultravioleta y visible*).

[NOTA: proteger las soluciones de la luz. Realizar rápidamente los procedimientos bajo luz tenue, o empleando materiales de vidrio inactínico.]

Todos los ensayos se realizan en solución de acetato de amonio 0,04 M (3,083 g por litro). Efectuar un barrido espectral entre 210 y 750 nm con un espectrofotómetro apropiado y empleando una solución de acetato de amonio 0,04 M como blanco.

Pérdida por secado <680> - Transferir aproximadamente 2,0 g de muestra, exactamente pesados, a un recipiente apropiado. Secar a 135 °C hasta peso constante. Calcular la pérdida de peso, en porcentaje, respecto del peso de la muestra.

Determinación de cloruro - Transferir aproximadamente 1,0 g de colorante, exactamente pesado, a un recipiente apropiado. Disolver en 100 ml de agua y acidificar con 5 ml de ácido nítrico 1,5 N. Determinar el contenido de cloruro de la solución por titulación, calcular el punto final potenciométricamente empleando un electrodo de plata-cloruro de plata y un electrodo de referencia de vidrio (ver *780. Volumetría*). Cada mililitro de nitrato de plata 0,1 N (SV) equivale a 0,00585 g de cloruro de sodio.

Determinación de sulfato - Transferir aproximadamente 5,0 g del colorante, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 250 ml y disolver en 100 ml de agua calentando en un baño de agua. Agregar 35 g de cloruro de sodio libre de sulfato, tapar el erlenmeyer y agitar por rotación a intervalos frecuentes durante 1 hora. Enfriar, transferir con solución saturada de cloruro de sodio a un matraz aforado de 250 ml y llevar a volumen con solución saturada de cloruro de sodio. Agitar el matraz y filtrar la solución a través de un papel de filtro seco. Transferir cuantitativamente 100 ml del filtrado a un vaso de precipitados de 500 ml, diluir a 300 ml con agua y acidificar con ácido clorhídrico agregando 1 ml de exceso. Calentar la solución a ebullición y agregar, gota a gota y con agitación, un

exceso de cloruro de bario 0,125 M. Dejar la mezcla en reposo durante 4 horas sobre una placa calefactora o durante toda la noche a temperatura ambiente y luego calentar a 80 °C. Dejar sedimentar el precipitado y filtrar. Lavar el precipitado con agua caliente hasta que los lavados den negativa la reacción para *Cloruro* (ver *410. Ensayos generales de identificación*). Colocar el precipitado en un crisol, previamente pesado, y someter a calcinación hasta peso constante. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Expresar el resultado como porcentaje en peso de sulfato de sodio.

Materia insoluble en agua - Transferir aproximadamente 4,0 g de muestra, exactamente pesados a un recipiente apropiado. Disolver con agitación en 200 ml de agua caliente (entre 80 y 90 °C) y dejar enfriar a temperatura ambiente. Filtrar a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad fina; previamente pesado, lavar con agua fría hasta que las aguas de lavado sean incoloras. Secar a 135 °C hasta peso constante. Calcular el porcentaje de materia insoluble en agua.

Extracto etéreo - Emplear un aparato de extracción tipo soxhlet. Colocar un pequeño trozo de alambre de cobre suspendido en el refrigerante y aproximadamente 0,5 g del mismo alambre en el balón. Transferir aproximadamente 2,0 g del colorante, exactamente pesados, al aparato de extracción y extraer con 150 ml de éter etílico o éter isopropílico durante 5 horas. Concentrar el extracto sobre un baño de vapor hasta aproximadamente 5 ml. Transferir a un cristalizador previamente pesado, evaporar en un baño de agua y luego secar a 105 °C hasta peso constante. El aumento de peso expresado como porcentaje con respecto a la muestra tomada corresponde al extracto etéreo.

Contenido de colorante -

Titulación con tricloruro de titanio -

METODO I - Preparar una solución al 1,0 % de la muestra en agua y colocar un volumen equivalente a 20 ml de tricloruro de titanio en un erlenmeyer de boca ancha de 500 ml. Agregar 15 g de citrato de sodio y agua hasta obtener un volumen entre 150 y 200 ml. Calentar a ebullición y titular con tricloruro de titanio 0,1 N (SV).

METODO II - Preparar una solución al 0,5 % de la muestra en alcohol. Proceder según se indica en *Método I* pero sustituyendo el agua por alcohol al 50 %.

METODO III - Proceder según se indica en *Método I* pero sustituyendo el citrato de sodio por 15 g de tartrato ácido de sodio.

[NOTA: para muchos colorantes el punto final de la titulación con tricloruro de titanio está indicado por una marcada decoloración. Para otros, sin embargo, el cambio es tan gradual que se requiere un exceso de tricloruro de titanio (no más de 0,3 ml de solución 0,1 N) y se debe emplear una solución patrón conveniente de algún otro colorante, haciendo una titulación por retorno (en general se emplea el azul de metileno). En otros casos es mejor emplear un indicador que se reduzca luego que el colorante haya reaccionado con el tricloruro de titanio. Se obtienen buenos resultados empleando una cantidad conocida de verde brillante como indicador en la titulación de tartrazina].

Valoración espectrofotométrica - [NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico]. Preparar la *Solución muestra* y una *Solución estándar* en acetato de amonio 0,04 M, de modo que la concentración sea la indicada para cada colorante. Determinar la absorbancia de ambas soluciones a la longitud de onda especificada, con un espectrofotómetro apropiado, empleando una solución de acetato de amonio 0,04 M como blanco. El porcentaje de colorante total calculado sobre la muestra no debe ser inferior al porcentaje especificado para cada colorante.

ESPECIFICACIONES DE COLORANTES

AMARANTO (CI 16185)

$C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ PM: 604,49

Definición - El Amaranto es esencialmente la sal trisódica del ácido 1-(4-sulfo-1,1-naftilazo)-2 – naftol-3,6-disulfónico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y/o sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color pardo rojizo a pardo rojizo oscuro. Expuesto a la luz ultravioleta no presenta fluorescencia apreciable. Soluble en agua.

Identificación cromatogrática - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,39.

Sistema B: R_f aproximadanente 0,24.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,02 mg por ml en el visible presenta un máximo a 522 nm y en el ultravioleta presenta máximos a 218 y 331 nm, un mínimo a 311 nm y otro mínimo entre 359 y 389 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato*

(calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 10 ppm.

Arsénico <540> - No más de 3 ppm.

Colorantes subsidiarios - [NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico.]

Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de metiletilcetona, acetona y agua (54:23:23).

Preparar una solución muestra que contenga 20 mg por ml y soluciones diluidas de la muestra de 0,05; 0,1 y 0,2 mg por ml, correspondientes al 0,25; 0,5 y 1 % respectivamente, empleando en todos los casos agua como solvente.

Aplicar por separado 3 µl de cada una de las soluciones sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con celulosa para cromatografía de aproximadamente 0,1 mm de espesor y desarrollar los cromatogramas en una cámara revestida internamente con papel de filtro y saturada durante 2 horas.

Realizar la estimación visual de las manchas secundarias de la *muestra* contra las manchas de las soluciones diluidas. Ninguna de las manchas secundarias debe ser mayor a 1 % y la suma de todas ellas no debe ser mayor a 3 %.

Contenido de colorante total -

Titulación con $TiCl_3$ - *Método I*. Cada mililitro de $TiCl_3$ 0,1 N equivale a 0,01511 g de $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$. Contiene no menos de 85,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,02 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 522 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

AMARILLO DE QUINOLINA(CI 47005)

$C_{18}H_9NO_8S_2Na_2$ (componente principal)

PM: 477,4 (derivado disulfónico) y 375,3 (derivado monosulfónico)

Definición - El Amarillo de quinolina es esencialmente una mezcla de sales sódicas de disulfonatos (principalmente), monosulfonatos y trisulfonatos de quinoftalona y quinolilinedandiona, junto con cloruro de sodio y sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color amarillo verdoso. Expuesto a la luz ultravioleta presenta fluorescencia amarillo anaranjada viva. Moderadamente soluble en agua.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,44.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,37.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,015 mg por ml en el visible presenta un máximo a 414 nm y en el ultravioleta presenta máximos a 225, 236 (muy pequeño) y 289 nm y mínimos a 233 (muy pequeño), 269 y 336 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado, Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 30 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Contenido de colorante total –

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,015 mg por ml. Determinar la absorbancia a 414 nm. Contiene no menos de 70,0 %.

AMARILLO OCASO FCF (CI 15985)

$C_{16}H_{10}O_7N_2S_2Na_2$ PM: 452,37

Definición - El Amarillo ocaso es esencialmente la sal disódica del ácido 1-*p*-sulfenilazo-2-naftol-6-sulfónico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color anaranjado rojizo. Expuesto a la luz ultravioleta no presenta fluorescencia apreciable. Soluble en agua.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,61.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,37.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,02 mg por ml en el visible presenta un máximo a 482 nm y en el ultravioleta presenta máximos a 235 y 314 nm y mínimos a 288 y 347 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Colorantes subsidiarios - [NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico].

Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de alcohol isoamílico, acetona, agua y amoníaco (65:50:20:5).

Preparar una solución muestra que contenga 20 mg por ml y soluciones diluidas de la muestra de 0,1; 0,2 y 0,5 rng por ml correspondientes al 0,5; 1 y 2,5 % respectivamente, empleando en todos los casos agua como solvente.

Aplicar por separado 3 µl de cada una de las soluciones sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con gel de sílice 60 para cromatografía de 0,2 mm de espesor. Desarrollar los cromatogramas en una cámara sin saturación.

Comparar visualmente las manchas secundarias de la muestra con las manchas de las soluciones diluidas, ninguna de las manchas secundarias debe ser mayor a 2 % y la suma de todas ellas no debe ser mayor a 5 %.

Contenido de colorante total -

Titulación con TiCl₃ - *Método I*. Cada mililitro de TiCI3 0,1 N equivale a 0,01132 g de $C_{16}H_{10}N_2O_7S_2Na_2$. Contiene no menos de 85,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,02 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 482 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

AZUL BRILLANTE FCF (CI 42090)

$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$ PM: 792,84

PM: 792,84

Definición - El Azul brillante FCF es esencialmente la Sal disódica de α-[4-(*N*-etil-3-sulfonatobencilamino)-ciclohexa-2,5-dienililideno]-tolueno-2-sulfonato y sus isómeros y colorantes subsidiarios, junto con cloruro y/o sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color violeta oscuro. Expuesto a la luz ultravioleta presenta color azul oscuro. Soluble en agua.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,72.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,31.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,006 mg por ml en el visible presenta máximos a 4 09 y 630 nm y un mínimo a 456 nm; y en el ultravioleta presenta un m áximo 308 nm y mínimos a 270 y 348 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Colorantes subsidiarios - [NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico].

Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de acetonitrilo, alcohol isoamílico, metiletilcetona, amoníaco y agua (50:50:15:5:5).

Preparar una solución muestra que contenga 20 mg por ml y una solución diluida que corresponda al 6 % de la muestra (1,2 mg por ml) que será empleada como estándar, empleando en ambos casos metanol como solvente.

Aplicar en banda 50 µl de la solución muestra sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con gel sílice 60 para cromatografía de 0,2 mm de espesor, reservando en la placa el espacio correspondiente a d os siembras para una posterior aplicación del estándar y realización del blanco. Desarrollar los cromatogramas en una cámara sin revestimiento interno y saturada durante 20 minutos. Retirar la placa de la cámara, secarla al reparo de la luz y repetir el desarrollo empleando la misma fase móvil.

Secar la placa al reparo de la luz y aplicar en banda 50 µl de la solución estándar.

En tres erlenmeyer de 50 ml con tapón de vidrio esmerilado colocar el raspado de las manchas secundarias de la muestra (excluyendo la mancha correspondiente al origen de siembra y la mancha inmediata superior a l a principal), el raspado del estándar y un blanco constituido por el raspado de

un sector limpio del cromatograma. Las tres áreas raspadas deben ser aproximadamente iguales.

A cada erlenmeyer agregar 6 ml de una mezcla de acetona y agua (1:1) y agitar durante 2 ó 3 minutos, luego agregar 18 ml de una solución bicarbonato de sodio 0,05 M y volver a agitar.

Recolectar cada solución con una jeringa de 50 ml, realizar una filtración por medio de un cabezal de filtración con membrana de celulosa regenerada de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de porosidad.

Determinar la absorbancia de la solución muestra y la solución estándar a 6 30 nm, empleando la solución blanco como referencia. Calcular el porcentaje total de colorantes subsidiarios por la fórmula siguiente:

$$6\left(A_M / A_E\right)$$

en la cual A_M es la absorbancia de la solución muestra y A_E la absorbancia de la solución estándar. El porcentaje total de colorantes subsidiarios no debe ser mayor a 6 %.

Contenido de colorante total -

Titulación con $TiCI_3$ - *Método III*. Cada mililitro de $TiCl_3$ 0,1 N equivale a 0,03964 g de $C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$. Contiene no menos de 85,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,006 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 630 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

AZUL PATENTE V (CI 42051)

$C_{54}H_{62}N_4O_{14}S_4Ca$ PM: 1.159,4 PM: 1159,4

Definición - Es esencialmente la sal cálcica del ácido disulfónico del anhídrido *m*-hidroxitetracetildiamino trifenil-carbinol y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y/o sulfato de sodio y/o cloruro de calcio y/o sulfato de calcio.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos color azul violeta, oscuro. Expuesto a la luz ultravioleta no presenta fluorescencia apreciable. Poco soluble en agua.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,67.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,39.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,005 mg por ml en el visible presenta máximos a 4 12 y 638 nm y un mínimo a 455 nm; y en el ultravioleta presenta máximos a 232 y 311 nm, un mínimo entre 254 y 269 nm y otro a 351 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Colorantes subsidiarios - [NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico].

Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de *n*-butanol, agua, etanol y amoníaco (600:264:135:6).

Preparar una solución muestra que contenga 20 mg por ml y soluciones diluidas de la muestra de 0,05; 0,1 y 0,2 mg por ml correspondientes al 0,25; 0,5 y 1 % respectivamente, empleando en todos los casos agua como solvente.

Aplicar por separado 3 µl de cada una de las soluciones sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con celulosa para cromatografía de 0,1 mm de espesor y desarrollar los cromatogramas en una cámara revestida internamente con papel de filtro y saturada durante 2 horas.

Realizar la estimación visual de las manchas secundarias de la muestra contra las manchas de las soluciones diluidas, sin tener en cuenta para tal fin la primera mancha de R_f inferior a la mancha principal. Ninguna de las manchas secundarias debe ser mayor a 0,5 % y la suma de todas ellas no debe ser mayor a 2 %.

Contenido de colorante total -

Titulación con $TiCl_3$ - *Método III*. Cada mililitro de $TiCI_3$ 0,1 N equivale a 0,02898 g de $C_{54}H_{62}N_4O_{14}S_4Ca$. Contiene no menos de 85,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,005 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 638 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

ERITROSINA (CI 45430)

$C_{20}H_6I_4O_5Na_2$ PM:879,87

Definición - La Eritrosina es esencialmente la sal disódica del ácido 2-(2,4,5,7-tetraiodo-3-oxo-6-oxoxanten-9-il) benzoico y colorantes

subsidiarios, junto con cloruro de sodio y/o sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color rojo sangre. Expuesto a la luz ultravioleta no presenta fluorescencia apreciable. Soluble en agua y en alcohol.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,79.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,54.

Identificación espectrofotométrica - (ver, *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,009 mg por ml en el visible presenta un máximo a 527 nm y en el ultravioleta presenta máximos a 262 y 308 nm, un mínimo entre 338 y 383 nm y mínimos a 238 y 289 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2%.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Iodo - Transferir una cantidad de muestra, exactamente pesada, que contenga el equivalente a 50 mg de iodo, a un vaso de precipitados de 500 ml. Disolver en 2 ml de solución de hidróxido de sodio al 30 %, diluir a 100 ml, agregar perlas de vidrio y 15 ml de solución de permanganato de potasio al 7 %. Cubrir con un vidrio de reloj y calentar a ebullición durante 5 minutos. Cuando cese la ebullición, agregar cuidadosamente 10 ml de ácido nítrico y hervir durante 5 minutos más. Lavar el vidrio de reloj y las paredes del vaso (puede haber exceso de permanganato de potasio). Agregar rápidamente 5 ml de nitrito de sodio al 10 % con agitación. Agregar nitrito de sodio, gota a gota, hasta que la suspensión se aclare, dejando que cada gota reaccione antes de agregar la siguiente. Si cuando la solución se decolora se observan partículas de dióxido de manganeso, no intentar destruirlas sino agregar inmediatamente solución de permanganato de potasio al 1 % en porciones de 1 ml hasta que la solución se torne rosada. [NOTA: si se requieren más de 2 ml o si aparece una coloración marrón, agregar primero 10 ml de solución diluida de permanganato de potasio y calentar a ebullición. Repetir la adición de nitrito de sodio, gota a gota, y agregar nuevamente solución diluida de permanganato de potasio hasta que la solución se torne rosada]. Filtrar rápidamente con succión a través de una placa de vidrio sinterizado. Lavar la placa con agua. Agregar solución de nitrito de sodio, gota a gota y con agitación, hasta decoloración total. Agregar 5 ml de solución de ácido sulfámico al 10 % y lavar las paredes del frasco. Enfriar a temperatura ambiente. Agregar 2 ó 3 g de ioduro de potasio y titular el iodo liberado con tiosulfato de sodio 0,1 N (SV), empleando almidón (SR) como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 0,002115 g de iodo. Contiene entre 56,8 y 58,5 %.

Ioduro de sodio - Transferir 5 g de muestra a un vaso de precipitados de 400 ml y agregar 150 ml de agua. Calentar a temperatura próxima a la ebullición y agregar 5 ml de ácido fosfórico concentrado. Digerir hasta que el precipitado coagule bien, enfriar a temperatura ambiente, transferir a un matraz aforado de 250 ml y llevar a volumen. Mezclar vigorosamente y filtrar. Descartar los primeros ml del filtrado. Transferir una alícuota de 100 ml del filtrado a un vaso de precipitados de 500 ml, agregar 2,5 ml de solución de hidróxido de sodio al 30 % y 15 ml de solución de permanganato de potasio al 7 %. Proceder según se indica en *Iodo* comenzando donde dice "*calentar a ebullición durante 5 minutos...* ". Cada mililitro de tiosulfato de sodio 0,1 N equivale a 0,002498 g de ioduro de sodio. Contiene no más de 0,4 %.

Contenido de colorante total -

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,009 mg por ml. Determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 527 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

INDIGO CARMIN (CI 73015)

$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ PM: 466,36

Definición - Es esencialmente una mezcla de la sal disódica del ácido 3,3'-dioxo-2,2'-bisindolilideno-5,5'-disulfónico y la sal disódica del ácido 3,3'-dioxo-2,2'-bisindolilideno-5,7'-disulfónico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y/o sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color azul marino fuerte. Expuesto a la luz ultravioleta no presenta fluorescencia apreciable. Poco soluble en agua.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,38.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,32.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,02 mg por ml en el visible presenta un máximo a 611 nm y un mínimo entre 401 y 478 nm; y en el ultravioleta presenta máximos a 252 y 287 nm y mínimos a 231 y 266 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,4 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 10 ppm.

Arsénico <540> - No más de 3 ppm.

Contenido de colorante total -

Titulación con $TiCl_3$ - Método III. Cada mililitro de $TiCl_3$ 0,1 N equivale a 0,02332 g de $C_{16}H_8N_2O_8S_2Na_2$. Contiene no menos de 85,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,02 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 611 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

NEGRO BRILLANTE BN (CI 28440)

$C_{28}H_{17}N_5O_{14}S_4Na_4$ PM:867,7

Definición - Es esencialmente la sal tetrasódica del ácido 4-acetamido-5-hidroxi-6-[7-sulfonato-4-(4- sulfonatofenilazo)-1-naftilazo]-naftaleno-1,7-disul-fónico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color negro grisáceo. Expuesto a la luz ultravioleta no presenta fluorescencia. Poco soluble en agua.

Identificación cromatogrática - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,24.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,28.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,02 mg por ml en el visible presenta máximos a 4 14 y 573 nm y un mínimo a 460 nm; y en el ultravioleta presenta un mínimo a 373 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 20 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Contenido de colorante total -

Titulación con. $TiCl_3$ - Método III. Cada mililitro de $TiCI_3$ 0,1 N equivale a 0,01086 g de $C_{28}H_{17}N_5O_{14}S_4Na_4$. Contiene no menos de 80,0 %.

Valoración. espectrofotométrica -

Concentración: 0,02 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 573 nm. Contiene no menos de 80,0 %.

PUNZÓ 4R (CI 16225)

$C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$ PM:604,5

Definición - El punzó 4R es esencialmente la sal trisódica del ácido 2-hidroxi-1-(4-sulfonato-1-naftilazo)-naftaleno-6,8-disulfónico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color rojo escarlata vivo. Expuesto a la luz ultravioleta presenta fluorescencia escarlata. Moderadamente soluble en agua.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,50.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,30.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,02 mg por ml en el visible presenta un máximo a 507 nm y en el ultravioleta presenta máximos a 2 17, 246 y 333 nm y mínimos a 238, 302 y 374 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 20 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Contenido de colorante total -

Titulación con $TiCl_3$ - *Método I*. Cada mililitro de $TiCl_3$ 0,1 N equivale a 0,02511 g de $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$. Contiene no menos de 80 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,02 mg por ml. Determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción aproximadamente a 507 nm. Contiene no menos de 80,0 %.

ROJO ALLURA AC (CI 16035)

$C_{18}H_{14}N_2O_8S_2Na_2$ PM:496,42

Definición - El Rojo Allura AC es esencialmente la sal disódica del ácido 2-hidroxi-1-(2-metoxi-5-metil-4-sulfonato-fenilazo) naftaleno-6-sulfónico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color rojo oscuro. Soluble en agua, insoluble en alcohol.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,62.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,36.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,02 mg por ml en el visible presenta un máximo a 499 nm y en el ultravioleta presenta máximos a 214, 225 y 315 nm y mínimos a 231, 262 y 351 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 10 ppm.

Arsénico <540> - No más de 3 ppm.

Colorantes subsidiarios - [NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico.]

Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de alcohol isoamílico, 1,4-dioxano, acetonitrilo, acetato de etilo, agua y amoníaco (10:10:10:10:10:2).

Preparar una solución muestra que contenga 20 mg por ml y soluciones diluidas de la muestra de 0,05; 0,1 y 0,2 mg por ml, correspondientes al 0,25; 0,5 y 1 % respectivamente, empleando en todos los casos agua como solvente.

Aplicar por separado 3 µl de cada una de las soluciones sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con gel de sílice 60 para cromatografía de 0,2 mm de espesor y desarrollar los cromatogramas en una cámara sin saturación.

Realizar la estimación visual de las manchas secundarias de la muestra contra las manchas de las soluciones diluidas. Ninguna de las manchas secundarias debe ser mayor a 1 % y la suma de todas ellas no debe ser mayor a 3 %.

Contenido de colorante total -

Titulación con $TiCI_3$ - *Método I*. Cada mililitro de $TiCI_3$ 0,1 N equivale a 0,02511 g de $C_{18}H_{14}N_2O_8S_2Na_2$. Contiene no menos de 85,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,02 mg por ml. Determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 499 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

TARTRAZINA (CI 19140)

$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ PM:534,4

Definición - La Tartrazina es esencialmente la sal trisódica del ácido 5-hidroxi-1-(4-sulfonatofenil)-(4-sulfofenilazo)-pirazol-3-carboxílico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y/o sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color anaranjado. Expuesto a la luz ultravioleta presenta fluorescencia anaranjada intensa. Soluble en agua, moderadamente soluble en alcohol.

Identificación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,29.

Sistema B: R_f aproximadamente 0,24.

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,02 mg por ml en el visible presenta un máximo a 426 nm y en el ultravioleta presenta un máximo a 258 nm y mínimos a 224 y 313 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Contenido de colorante total -

Tilulación con $TiCl_3$ - Método III. Cada mililitro de $TiCI_3$ 0,1 N equivale a 0,01336 g de $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$. Contiene no menos de 85,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,02 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 426 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

VERDE S (CI 44090)

$C_{27}H_{25}N_2O_7S_2Na$ PM:576,63

Definición - El Verde S es esencialmente la sal sódica del ácido 5-[4-dimetilamino-α-[4-dimetiliminiocivlohexa-2,5-dienililideno)bencil]-6-hidroxi-7-sulfonaftaleno-2-sulfónico y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y de sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color marrón oscuro. Expuesto a la luz ultravioleta presenta color pardo violáceo oscuro. Soluble en agua; poco soluble en etanol.

ldentifcación cromatográfica - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,61.

Sistema C: R_f aproximadamente 0,07 (aplicar 50 µl en forma de banda).

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,007 mg por ml en el visible presenta un máximo a 635 nm y mínimos a 357 y 498 nm; y en el ultravioleta presenta máximos a 239 y 304 nm y un mínimo a 272 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 20 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más de 0,2 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Valoración del colorante total -

Titulación con -$TiCI_3$ - Método III. Cada mililitro de $TiCl_3$ 0,1 N equivale a 0,02883 g de $C_{27}H_{25}N_2O_7S_2Na$. Contiene no menos de 80,0 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,007 mg por ml. Determinar la absorbancia a l a longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 635 nm. Contiene no menos de 80,0 %.

VERDE SÓLIDO FCF (CI 42053)

$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$ PM:808,86

Definición - El Verde sólido FCF es esencialmente la sal disódica del ácido *N*-etil-*N*-[4-[[4-[etil-[(3-sulfofenil)metil]amino]fenil](4-hidroxi-2-sulfofenil)metileno]-2,5-ciclohexadien-l-iliden]-3-sulfobenzometanamina, isómeros y colorantes subsidiarios, junto con cloruro de sodio y sulfato de sodio como principales componentes incoloros.

Caracteres generales - Polvo homogéneo o gránulos de color verde azulado. Expuesto a la luz ultravioleta presenta fluorescencia color verde. Soluble en agua; moderadamente soluble en etanol.

Identificación cromatográfca - (ver *Identificación cromatográfica* en *Métodos generales de análisis*).

Sistema A: R_f aproximadamente 0,61.

Sistema C: R_f aproximadamente 0,02 (aplicar 50 µl en forma de banda).

Identificación espectrofotométrica - (ver *Identificación espectrofotométrica* en *Métodos generales de análisis*). Una solución de 0,006 mg por ml en el visible presenta máximos a 4 20 y 625 nm y un mínimo a 485 nm; y en el ultravioleta presenta un máximo a 302 nm, un mínimo entre 247 y 269 nm y otro a 356 nm.

Pérdida por secado, cloruro y sulfato - La suma de *Pérdida por secado*, *Cloruro* y *Sulfato* (calculados como sales sódicas) no es mayor de 15 %.

Materia insoluble en agua - No más de 0,2 %.

Extracto etéreo - No más, de 0,4 %.

Plomo <600> - No más de 20 ppm.

Arsénico <540> - No más de 2 ppm.

Colorantes subsidiarios - [NOTA: proteger las soluciones de la luz. Proceder rápidamente empleando luz tenue o materiales de vidrio inactínico].

Emplear una fase móvil constituida por una mezcla de acetonitrilo, alcohol isoamílico, metiletilcetona, agua y amoníaco (50:50:15:10:5).

Preparar una solución muestra que contenga 20 mg por ml y una solución diluida que corresponda al 6 % de la muestra (1,2 mg por ml)

que será empleada como estándar, empleando en ambos casos metanol como solvente.

Aplicar en banda 50 µl de la solución muestra sobre una placa para cromatografía en capa delgada recubierta con gel de sílice 60 para cromatografía de 0,2 mm de espesor, reservando en la placa el espacio correspondiente a dos siembras para una posterior aplicación del estándar y realización del blanco. Desarrollar los cromatogramas en una cámara sin revestimiento interno y saturada durante 20 minutos. Retirar la placa de la cámara, secarla al reparo de la luz y repetir el desarrollo empleando la misma fase móvil.

Dejar secar la placa al reparo de la luz y aplicar en banda 50 µl de la solución estándar.

En tres erlenmeyer de 50 ml con tapón de vidrio esmerilado, colocar el raspado de las manchas secundarias de la muestra (excluyendo la mancha correspondiente al origen de siembra y la mancha inmediata superior a la principal), el raspado del estándar y un blanco constituido por el raspado de un sector limpio del cromatograma. Las tres áreas raspadas deben ser aproximadamente iguales.

A cada erlenmeyer agregar 6 ml de una mezcla de acetona y agua (1:1) y agitar durante 2 ó 3 minutos. Luego agregar 18 ml de una solución de bicarbonato de sodio 0,05 M y volver agitar.

Recolectar cada solución con una jeringa de 50 ml, filtrar por medio de un cabezal de filtración con membrana de celulosa regenerada de 13 mm de diámetro y 0,45 µm de porosidad.

Determinar la absorbancia de la solución muestra y de la solución estándar a 630 nm, empleando la solución blanco como referencia. Calcular el porcentaje total de colorantes subsidiarios por la fórmula siguiente:

$$6\left(A_M / A_E\right)$$

en la cual A_M es la absorbancia de la solución muestra y A_E la absorbancia de la solución estándar. El porcentaje total de colorantes subsidiarios no debe ser mayor a 6 %.

Contenido de colorante total -

Tilulación con $TiCI_3$ - Método III. Cada mililitro de $TiCl_3$ 0,1 N equivale a 0,0404 g de $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$. Contiene no menos de 85 %.

Valoración espectrofotométrica -

Concentración: 0,006 mg por ml. Determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 625 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

Concentración: 0,006 mg por ml. Determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, aproximadamente a 625 nm. Contiene no menos de 85,0 %.

60. COMBUSTIÓN EN ERLENMEYER CON OXÍGENO

Este ensayo se realiza como etapa preliminar para la determinación de bromo, cloro, iodo, selenio y azufre en productos farmacopeicos. La combustión del material a ensayar, generalmente orgánico, produce compuestos inorgánicos solubles en agua, en los que se analizan los elementos especificados en la monografía o el capítulo general correspondiente.

Aparato (ver *Figura*) - Consta de un erlenmeyer de 500 ml (a menos que se especifique uno de mayor volumen) de paredes gruesas, cuyo borde se eleva formando un reservorio alrededor del tapón. El tapón de vidrio esmerilado lleva soldado un soporte para la muestra que consiste en un alambre de platino y una pieza formada por una malla de platino soldada que mide aproximadamente 1,5 cm × 2 cm.

Procedimiento -

Precaución - Se debe trabajar con anteojos protectores y extremando las medidas de seguridad. El analista debe asegurarse que el erlenmeyer esté perfectamente limpio.

Pesar la sustancia, si es un sólido, en un cuadrado de papel de filtro libre de haluros, de aproximadamente 4 cm de lado; plegar el papel envolviendo la muestra. Las sustancias líquidas se pesan en cápsulas previamente pesadas para volúmenes menores de 200 µl se emplean cápsulas de acetato de celulosa y para volúmenes mayores de 200 µl son útiles las cápsulas de gelatina. [NOTA: las cápsulas de gelatina pueden contener cantidades significativas de haluros o azufre. Si se emplean tales cápsulas, se debe realizar una titulación empleando un blanco y hacer las correcciones necesarias]. Asegurar la muestra en la malla de platino junto con una tira de papel de filtro que, a modo de mecha, está destinada a provocar la combustión cuando se la enciende. Agregar en el erlenmeyer el líquido absorbente, especificado en la monografía o el capítulo general correspondiente; humedecer con agua la junta esmerilada del erlenmeyer y desplazar el aire del mismo con una corriente de oxígeno, tapar provisoriamente el erlenmeyer con un tapón apropiado hasta que se encienda la mecha. Agitar por rotación el líquido para favorecer la absorción del oxígeno. [NOTA: la saturación del líquido con oxígeno es esencial para el éxito del procedimiento de combustión]. Encender la tira de papel y sumergir de inmediato el soporte de la muestra en el erlenmeyer. Mantener firmemente ajustado el tapón durante todo el proceso de combustión e invertir el erlenmeyer para que la solución de absorción forme un cierre hermético alrededor del mismo. Evitar que caiga en el líquido cualquier sustancia que no se haya quemado completamente. Una vez finalizada la combustión, agitar el erlenmeyer vigorosamente y dejar reposar durante no menos de 10 minutos con agitación intermitente. Luego proceder según se especifique en la monografía o el capítulo general correspondiente.

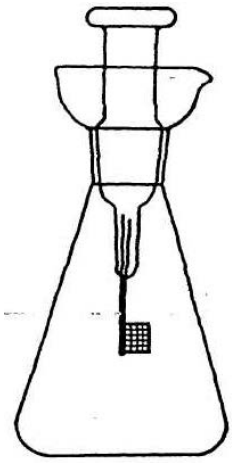


Figura. Aparato para combustión en erlenmeyer con oxígeno.

Actualización parcial

70. CONDUCTIVIDAD

La resistividad eléctrica ρ de una solución acuosa es por definición la resistencia en corriente alterna medida en ohms entre las caras opuestas de un cubo de un centímetro de lado de una solución acuosa a una temperatura especificada.

La conductividad κ, de una solución es por definición la función inversa de la resistividad ρ. La resistencia R, de un conductor de sección transversal A, y longitud L, está dada por la siguiente expresión:

$$R = \rho \frac{L}{A}$$

o sea,

$$R = \frac{1}{\kappa}\frac{L}{A} \quad \text{ó} \quad \kappa = \frac{1}{R}\frac{L}{A}$$

La unidad de conductividad en el Sistema Internacional es el siemens por metro (S m^{-1}). En la práctica la conductividad eléctrica de una solución se expresa en siemens por centímetro (S cm^{-1}) o en microsiemens por centímetro (µS cm^{-1}). La unidad de resistividad en el Sistema Internacional es el ohm por metro (Ω m) y para el caso de la resistividad de soluciones es el ohm por centímetro (Ω cm). A menos que se especifique de otro modo, la temperatura para la expresión de la conductividad o la resistividad es de 25,0 °C y debe estabilizarse dentro de ± 0,1 °C.

Aparato - Emplear un instrumento que puede ser un puente Wheatstone de operación manual o equivalente, o un instrumento de medición de lectura directa analógica o digital, el cual mide la resistencia de una columna de líquido entre los electrodos de un dispositivo de medida sumergido (celda conductimétrica).

El aparato se provee con corriente alterna para evitar los efectos de polarización del electrodo y está equipado con un dispositivo de compensación de temperatura o un termómetro de precisión.

La celda conductimétrica contiene dos electrodos paralelos de platino, recubiertos con negro de platino, cada uno con un área A, y separados uno de otro por una distancia L. Ambos están generalmente protegidos por un tubo de vidrio que permite un buen intercambio entre la solución y los electrodos.

Las celdas de platino con negro de platino no deben usarse para la medición de conductividades por debajo de 10 µs cm^{-1} a menos que pueda usarse una celda con sólo trazas de negro de platino para mediciones entre 0,1 y 10 µs cm^{-1}; las celdas para las mediciones en este rango deben reservarse con exclusividad para este uso.

Debe considerarse la influencia de dióxido de carbono presente en el aire al medir aguas de muy baja conductividad ya que éste puede producir un aumento significativo de la conductividad medida al disolverse en el agua. Donde sea posible, debe evitarse el contacto del aire con el agua de baja conductividad mediante celdas de flujo o bien aislando la superficie expuesta mediante gases inertes químicamente puros, tales como el nitrógeno o el helio.

La constante C, de la celda conductimétrica se expresa en cm^{-1} de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$C = \alpha \frac{L}{A}$$

en la cual α es un coeficiente adimensional característico del diseño de la celda.

Preparación de soluciones estándar

Solución estándar A - Preparar una solución que contenga 0,7440 g de cloruro de potasio por cada litro de solución a 20 °C, empleando agua libre de dióxido de carbono, preparada con agua cuya conductividad no excede de 2 µS cm^{-1}.

Solución estándar B - Diluir 100 ml de la *Solución estándar A* a 1 litro a 20 °C.

La conductividad de las dos soluciones estándar de cloruro de potasio, a las temperaturas de 0 °C, 18 °C y 25 °C se indican en la *Tabla*.

Tabla.

Solución estándar	Normalidad aproximada de la solución	Temperatura °C	Conductividad µS cm^{-1}
A	0,01	0	773,6
		18	1.220,5
		25	1.408,8
B	0,001	0	77,69
		18	127,54
		25	146,93

Las conductividades indicadas de la *Tabla* no incluyen la conductividad del agua usada para preparar las soluciones.

Procedimiento

Determinación de la constante de la celda – Elegir una celda conductimétrica apropiada para la conductividad de la solución muestra a medir. Cuanto mayor sea la conductividad esperada, mayor debe ser la constante de la celda elegida (baja ρ), para que el valor de *R* medido sea tan grande como sea posible para el aparato empleado. Las celdas conductimétricas comúnmente empleadas, tienen una constante del orden de 0,1; 1 y 10 cm^{-1}. Emplear una solución estándar de cloruro de potasio apropiada. Enjuagar varias veces la celda con agua libre de dióxido de carbono, y al menos dos veces con la solución estándar de cloruro de potasio empleada para determinar la constante de la celda conductimétrica. Medir la resistencia de la celda conductimétrica con la solución estándar de cloruro de potasio a 25,0 ± 0,1 °C o a la temperatura especificada en la monografía correspondiente. Repetir la medición con porciones adicionales de la solución estándar de cloruro de potasio hasta que el valor obtenido permanezca constante. La constante de la celda conductimétrica *C*, en cm^{-1}, está dada por la expresión:

$$C = R_{KCl}\kappa_{KCl}$$

en la cual R_{KCl} es la resistencia medida, en megaohms, y K_{KCl} es la conductividad de la solución estándar de cloruro de potasio empleada, expresada en µS cm^{-1}.

La medida de la constante de la celda conductimétrica *C*, deberá estar comprendida dentro del ± 2 % del valor indicado.

Determinación de la conductividad de la solución a ensayar - Luego de calibrar el aparato con una de las soluciones estándar, enjuagar la celda conductimétrica varias veces con agua libre de dióxido de carbono y al menos dos veces con la solución muestra a 25,0 ± 0,1 °C o a la temperatura especificada en la monografía correspondiente. Proceder con las sucesivas mediciones según como se especifique en la monografía correspondiente.

75. CONDUCTIVIDAD EN AGUA CALIDAD FARMACÉUTICA

En este ensayo se incluyen dos etapas preliminares. Si las condiciones de ensayo y los límites de conductividad se cumplen en cualquiera de las etapas preliminares, el Agua Calidad Farmacéutica cumple con los requisitos del ensayo cuando se especifique en la monografía. En estas circunstancias es innecesario proceder con la tercera etapa. La muestra no cumple con los requisitos del ensayo sólo si no cumple con la tercera etapa.

Procedimiento

ETAPA 1

1. Determinar la temperatura y la conductividad del agua realizando una lectura de conductividad no compensada por temperatura. La medida puede llevarse a cabo en un recipiente apropiado o como una medida en línea.

2. Empleando la *Tabla 1. Etapa 1. Requisitos de conductividad y temperatura*, encontrar el valor de temperatura inmediata inferior a la temperatura medida. El valor de conductividad correspondiente es el límite a esa temperatura.

3. Si la conductividad medida no es mayor que el valor de la *Tabla 1*, el agua cumple los requisitos del ensayo de conductividad. Si la conductividad es mayor que el valor indicado en la *Tabla 1*, proceder con la *Etapa 2*.

ETAPA 2

4. Transferir una cantidad suficiente de agua (100 ml o más) a un envase apropiado y agitar. Ajustar la temperatura, si fuera necesario, y mientras se la mantiene a 25 ± 1 °C, comenzar a agitar vigorosamente la muestra y observar periódicamente la conductividad. Cuando el cambio en la conductividad (debido a la captación del dióxido de carbono atmosférico) es menor que el valor neto de 0,1 µS/cm durante 5 minutos, registrar la conductividad.

5. Si la conductividad no es mayor que 2,1 µS/cm, el agua cumple con los requisitos del ensayo de conductividad. Si la conductividad es mayor que 2,1 µS/cm, proceder con la *Etapa 3*.

ETAPA 3

6. Realizar este ensayo dentro de los 5 minutos aproximadamente de la determinación de la conductividad en el *Paso 5*, mientras se mantiene la temperatura de la muestra a 25 ± 1 °C. Agregar una solución saturada de cloruro de potasio a la misma muestra de agua (0,3 ml por cada 100 ml de muestra), y determinar el pH con una exactitud de 0,1 unidades de pH, según se indica en *250. Determinación del pH.*

7. Empleando la *Tabla 2. Etapa 3. Requisitos de conductividad y pH*, determinar el límite de la conductividad al valor de pH medido. Si la conductividad medida en el *Paso 4* no es mayor que los requisitos de conductividad para el pH determinado en el *Paso 6*, el agua cumple con los requisitos para el ensayo de conductividad. Si la conductividad medida es mayor que este valor o el pH se encuentra fuera del intervalo entre 5,0 y 7,0, el agua no cumple con los requisitos para el ensayo de conductividad.

Tabla 1. Etapa 1. Requisitos de conductividad y temperatura (para medidas de conductividad no compensada por temperatura)

Temperatura (°C)	Requisito de conductividad (µS/cm)*
0	0,6
5	0,8
10	0,9
15	1,0
20	1,1
25	1,3
30	1,4
35	1,5
40	1,7
45	1,8
50	1,9

55	2,1
60	2,2
65	2,4
70	2,5
75	2,7
80	2,7
85	2,7
90	2,7
95	2,9
100	3,1

*μS/cm (microSiemen por centímetro) = μmho/cm = recíproco de Megahm-cm.

Tabla 2. Etapa 3. Requisitos de conductividad y pH
(para muestras equilibradas con la atmósfera y con la temperatura)

pH	Requisito de conductividad (μS/cm)*
5,0	4,7
5,1	4,1
5,2	3,6
5,3	3,3
5,4	3,0
5,5	2,8
5,6	2,6
5,7	2,5
5,8	2,4
5,9	2,4
6,0	2,4
6,1	2,4
6,2	2,5
6,3	2,4
6,4	2,3
6,5	2,2
6,6	2,1
6,7	2,6
6,8	3,1
6,9	3,8
7,0	4,6

* μS/cm (microSiemen por centímetro) = μmho/cm = recíproco de Megahm-cm.

80. CONSERVANTES

Los conservantes son sustancias auxiliares que se agregan a l as preparaciones oficiales para protegerlas de la contaminación microbiana.

Cualquier agente antimicrobiano puede exhibir propiedades conservantes, sin embargo, se debe tener en cuenta que todos los agentes antimicrobianos útiles son sustancias tóxicas. Para evitar efectos adversos, la concentración de los conservantes en el producto terminado debe ser la concentración mínima que presenta el efecto antimicrobiano buscado y considerablemente más baja que la concentración tóxica en seres humanos.

En ningún caso se debe emplear un conservante para prevenir contaminaciones debidas a malas prácticas de elaboración.

Se establecen a co ntinuación los ensayos de *Eficacia y Contenido*.

EFICACIA

Los siguientes ensayos se emplean para demostrar la eficacia de los conservantes agregados a p roductos sean o no estériles, envasados en envases multidosis. En el caso de productos no estériles, se han agregado para inhibir el crecimiento de microorganismos que hubieran sido introducidos accidentalmente durante o después del proceso de elaboración, mientras que en los productos estériles, ya sean parenterales, óticos, nasales u oftálmicos, deben también inhibir el crecimiento de microorganismos que pudieran introducirse durante las extracciones repetidas de las dosis individuales.

Estos ensayos se aplican solamente al producto en el envase original antes de su empleo.

Microorganismos de ensayo - Emplear cultivos de los siguientes microorganismos [NOTA: pueden emplearse cultivos provenientes de otras colecciones que posean las mismas características]:

Candida albicans (ATCC N° 10231)
Aspergillus niger (ATCC N° 16404)
Escherichia coli (ATCC N° 8739)
Pseudomonas aeruginosa (ATCC N° 9027)
Staphylococcus aureus (ATCC N° 6538)

Además de los microorganismos mencionados, se pueden incluir otros, especialmente si dichos microorganismos pueden introducirse durante el empleo del producto.

Medios - Para el cultivo inicial de los microorganismos se debe seleccionar un medio que favorezca el crecimiento del respectivo cultivo madre, como por ej., Agar Digerido de Caseína Soja (Ver *90. Control higiénico de productos no obligatoriamente estériles*).

Preparación del inóculo - Antes de llevar a cabo el ensayo, inocular superficialmente sendas placas de Petri que contengan un volumen apropiado del medio seleccionado, con cultivos madre recientemente desarrollado de cada uno de los microorganismos especificados.

Incubar los cultivos bacterianos a una temperatura entre 30 y 35 °C durante 18 a 24 horas, los cultivos de *C. albicans* entre 20 y 25 °C durante 48 horas y los cultivos de *A. niger* entre 20 y 25 °C durante 1 semana.

Recolectar los cultivos bacterianos y de *C. albicans* empleando Solución fisiológica (SR) estéril. Transferir el líquido a un recipiente apropiado y agregar suficiente Solución fisiológica (SR) estéril para reducir la cantidad de microorganismos a 100 millones de microorganismos por ml, aproximadamente. Para recolectar el cultivo de *A. niger,* emplear Solución fisiológica (SR) estéril que contenga 0,05 % de Polisorbato 80 y ajustar el número de esporas a 100 millones por ml aproximadamente, agregando más Solución fisiológica (SR) estéril.

Alternativamente, los microorganismos del cultivo madre pueden desarrollarse en un medio líquido apropiado y las células recolectarse por centrifugación, lavarse y resuspenderse en Solución fisiológica (SR) estéril hasta llegar al número de esporas o microorganismos requerido.

Determinar en cada suspensión el número de unidades formadoras de colonias por ml (ufc/ml), este valor sirve para determinar el tamaño del inóculo a s er empleado en el ensayo. Si las suspensiones estandarizadas no se emplean en un lapso de tiempo razonable, es necesario controlarlas periódicamente, por el método de recuento en placa, para determinar la viabilidad de los cultivos.

Para el recuento en placa de las preparaciones de ensayo inoculadas, emplear el mismo medio empleado para el cultivo inicial del microorganismo correspondiente. Si hubiera un inactivador específico del agente conservante, agregar una cantidad apropiada del mismo al agar.

Procedimiento - Cuando el envase del producto se presenta con un tapón de goma, que permite acceder al contenido asépticamente por medio de una aguja y una jeringa, llevar a cabo el

ensayo en cinco envases originales del producto. Si el envase del producto no permite la extracción aséptica, transferir muestras de 20 ml del producto a cada uno de cinco tubos de ensayo de tamaño apropiado, estéril y cerrado. Inocular cada tubo o envase del producto con cada una de las suspensiones microbianas ya calibradas, en una proporción de 0,10 ml de inóculo por cada 20 ml de producto y mezclar. Se debe agregar una concentración apropiada del microorganismo de ensayo de modo tal que la concentración en la preparación a ensayar, inmediatamente después de la inoculación, sea entre 10^5 y 10^6 microorganismos por ml. Determinar el número de microorganismos viables en cada suspensión del inóculo y calcular la concentración inicial de microorganismos por ml del producto en ensayo, por el método de recuento en placa.

Incubar los envases o tubos inoculados a una temperatura entre 20 y 25 °C. Examinar los envases o tubos a los 7, 14, 21 y 28 días siguientes a la inoculación. Registrar cualquier cambio de aspecto y determinar, por recuento en placa, el número de microorganismos viables presentes en cada intervalo de tiempo. Calcular el porcentaje de cambio en la concentración de cada microorganismo durante el ensayo, empleando las concentraciones teóricas de los microorganismos presentes al comienzo del ensayo.

Interpretación - El agente conservante resulta eficaz para el producto ensayado cuando: (a) las concentraciones de bacterias viables se reducen a no más de 0,1 % de la concentración inicial al día 14, (b) las concentraciones de levaduras y hongos viables permanecen en la concentración inicial o por debajo de la misma durante los primeros 14 días y (c) la concentración de cada microorganismo de ensayo permanece en los niveles indicados o por debajo de los mismos durante los días restantes del período de ensayo.

CONTENIDO

Los métodos proporcionados aquí se emplean para demostrar que el conservante está presente y su concentración no excede en más de 20 % la cantidad declarada.

La concentración de un conservante agregado a una preparación parenteral, ótica, nasal u oftálmica, monodosis o multidosis puede disminuir durante la vida útil del producto. Debido a esto, el elaborador determinará la menor concentración a la cual el conservante es eficaz. En el momento de su elaboración, el producto debe contener la cantidad declarada de conservante (dentro de ± 20%, admitiendo las variaciones debidas al proceso de elaboración). La afirmación del rótulo en cuanto al contenido del conservante no significa que esa cantidad declarada se mantenga, durante la vida útil del producto, hasta más de 20 %.

Los agentes más comúnmente empleados incluyen, los cuatro ésteres homólogos del ácido *p*-hidroxibenzoico, fenol, alcohol bencílico, clorobutanol y dos derivados mercuriales, nitrato fenilmercúrico y tiomersal. Para la determinación de los derivados mercuriales se emplean métodos polarográficos, mientras que la cromatografía de gases se emplea en la determinación de los otros agentes.

MÉTODO GENERAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

Los procedimientos generales que se establecen a continuación son aplicables a la determinación cuantitativa del alcohol bencílico, clorobutanol, fenol y los ésteres metílico, etílico, propílico y butílico del ácido *p*-hidroxibenzoico, tratándose éstos: como un grupo, aunque el método puede emplearse para la determinación individual. Preparar la *Solución del estándar interno* y la *Preparación estándar* para cada agente según se indica a continuación para cada caso. A menos que se indique de otro modo, preparar la *Preparación muestra* con porciones exactamente medidas de la *Solución del estándar interno* y la muestra, de modo que la concentración del conservante y la composición del solvente sean similares a la concentración y a la composición de la *Preparación estándar*. Los parámetros operativos sugeridos para el cromatógrafo de gases se indican en la *Tabla*. Emplear un detector de ionización a la llama y helio o nitrógeno como gas transportador.

Tabla. Parámetros operativos sugeridos para el cromatógrafo de gases

	Fase estacionaria y soporte	Dimensiones de la columna	Caudal (ml/min)	Temperatura de la columna (°C)
Alcohol bencílico	Polietilenglicol al 5 % (peso molecular entre 15.000 y 20.000) sobre soporte de tierra silícea calcinada y lavada con ácido.	1,8 m × 3 mm	50	140
Clorobutanol	Polietilenglicol al 5 % (peso molecular entre 15.000 y 20.000) sobre soporte de tierra silícea calcinada y lavada con ácido.	1,8 m × 2 mm	20	110
Fenol	Polietilenglicol al 5 % (peso molecular entre 15.000 y 20.000) sobre soporte de tierra silícea calcinada y lavada con ácido.	1,2 m × 3 mm	50	145
Parabenos	Dimetilpolisiloxano al 5 % sobre soporte de tierra silícea calcinada y lavada con ácido.	1,8 m × 2 mm	20	150

Alcohol bencílico

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 380 mg de fenol a un matraz aforado de 200 ml. Disolver en 10 ml de metanol, completar con agua a volumen y mezclar.

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 180 mg de alcohol bencílico, exactamente pesados, a un matraz aforado de 100 ml. Disolver en 20,0 ml de metanol, completar a volumen con *Solución del estándar interno* y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos para el alcohol bencílico y el fenol en el cromatograma de la *Preparación estándar*, designándolas P_1 y P_2, respectivamente. Del mismo modo, determinar los valores correspondientes p_1 y p_2, para la *Preparación muestra*. Calcular el contenido de alcohol bencílico (C_7H_8O), en mg por ml, en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$100(C/V)(p_1/p_2)(P_2/P_1)$$

en la cual C es la concentración, en mg por ml, de alcohol bencílico en la *Preparación estándar* y V es el volumen de muestra, en ml, empleado para preparar 100 ml de la *Preparación muestra*.

Clorobutanol

[NOTA: mantener el inyector a 180 °C y el detector a 220 °C].

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 140 mg de benzaldehído a un matraz aforado de 100 ml, agregar 10 ml de metanol y agitar hasta disolución. Completar con agua a volumen y mezclar.

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 125 mg de clorobutanol, exactamente pesados, a un matraz aforado de 25 ml. Agregar 2 ml de metanol, agitar hasta disolución, completar con agua a volumen y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución y 5,0 ml de *Solución del estándar interno* a un matraz aforado de 25 ml y mezclar. La solución así obtenida tiene una concentración conocida de aproximadamente 2,5 mg de clorobutanol por ml.

Preparación muestra - Diluir, si fuera necesario, un volumen exactamente medido de la muestra, cuantitativamente con metanol, hasta obtener una solución que contenga no más de 5,0 mg de clorobutanol por ml. Combinar 3,0 ml de esta solución con 3,0 ml de *Solución del estándar interno* y mezclar.

Aptitud del sistema (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, R, entre los picos del benzaldehído y el clorobutanol no es menor de 2,0; los tiempos de retención relativos son aproximadamente 0,8 para el benzaldehído y 1,0 para el clorobutanol y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los

cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular la cantidad, en mg, de clorobutanol ($C_4H_7Cl_3O$) en cada ml de la muestra, por la fórmula siguiente:

$$C(L/D)(R_M/R_E)$$

en la cual *C* es la concentración, en mg por ml, de clorobutanol, calculado sobre la sustancia anhidra, en la *Preparación estándar*, *L* es la cantidad declarada, en mg, de clorobutanol en cada ml de la muestra, *D* es la concentración, en mg por ml, de clorobutanol en la *Preparación muestra*, considerando el volumen de muestra tomado y el grado de dilución y R_M y R_E son los cocientes entre las respuestas de los picos de clorobutanol y benzaldehído obtenidos a partir de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

Fenol

Solución del estándar interno - Transferir 1 ml de alcohol bencílico a un matraz aforado de 500 ml, completar con metanol a volumen y mezclar.

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 75 mg de fenol, exactamente pesados, a un matraz aforado de 100 ml, disolver en 7,5 ml de metanol y agregar 20,0 ml de *Solución del estándar interno*. Completar con agua a volumen y mezclar.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 3 µl) de la *Preparación estándar* y la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de fenol y de alcohol bencílico en el cromatograma de la *Preparación estándar*, designándolos P_1 y P_2, respectivamente. Del mismo modo, determinar los valores correspondientes a p_1 y p_2, para la *Preparación muestra*. Calcular el contenido de fenol (C_6H_6O), en mg por ml, en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$100(C/V)(p_1/p_2)(P_2/P_1)$$

en la cual *C* es la concentración, en mg por ml, de fenol en la *Preparación estándar* y *V* es el volumen de muestra, en ml, empleado para preparar 100 ml de la *Preparación muestra*.

Metilparabeno y propilparabeno

Solución del estándar interno - Transferir aproximadamente 200 mg de benzofenona a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con éter y mezclar.

Preparación estándar - Transferir 100 mg de metilparabeno y 10 mg de propilparabeno, exactamente pesados, a un matraz aforado de 200 ml, diluir a volumen con *Solución del estándar interno* y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un erlenmeyer de 25 ml y proceder según se indica para la *Preparación muestra*, comenzando donde dice "*Agregar 3 ml de piridina...* ".

Preparación muestra - Transferir 10 ml de muestra y 10 ml de *Solución del estándar interno* a una ampolla de decantación. Agitar y dejar que las fases se separen. Transferir la fase acuosa a una segunda ampolla de decantación y la fase etérea a un erlenmeyer a través de un embudo que contenga sulfato de sodio anhidro. Extraer la fase acuosa con dos porciones de 10 ml de éter y filtrar los extractos a través de sulfato de sodio anhidro. Evaporar los extractos combinados bajo una corriente de aire seco hasta que el volumen se reduzca a 10 ml aproximadamente. Transferir el residuo obtenido a un erlenmeyer de 25 ml. Agregar 3 ml de piridina, completar la evaporación del éter y calentar a ebullición sobre una placa calefactora hasta que el volumen se reduzca a 1 ml aproximadamente. Enfriar y agregar 1,0 ml de un agente silanizante apropiado, como hexametildisilazano al cual se le ha agregado trimetilclorosilano, bis(trimetilsilil)acetamida, o bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida. Mezclar y dejar reposar durante no menos de 15 minutos.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 2 µl) de la solución silanizada de la *Preparación estándar* y la solución silanizada de la *Preparación muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos de metilparabeno, propilparabeno y benzofenona, designándolas P_1, P_2 y P_3, respectivamente. Del mismo modo, determinar los valores correspondientes a p_1, p_2 y p_3, para la solución silanizada de la *Preparación muestra*. Calcular el contenido, en µg por ml, de metilparabeno ($C_8H_8O_3$) en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$10(C_M/V)(p_1/p_3)(P_3/P_1)$$

en la cual C_M, es la concentración, en µg por ml, de metilparabeno en la *Preparación estándar* y *V* es el volumen de muestra tomado, en ml. Calcular el contenido, en µg por ml, de propilparabeno ($C_{10}H_{12}O_3$) en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$10(C_P/V)(p_2/p_3)(P_3/P_2)$$

en la cual C_P es la concentración, en µg por ml, de propilparabeno en la *Preparación estándar*. El etilparabeno y el butilparabeno pueden determinarse del mismo modo.

MÉTODO POLAROGRÁFICO

Nitrato fenilmercúrico

Preparación estándar - Transferir aproximadamente 100 mg de nitrato fenilmercúrico, exactamente pesados, a un matraz aforado de 1 litro, disolver en solución de hidróxido de sodio (1 en 250) y calentar, si fuera necesario para disolver. Completar a volumen con solución de hidróxido de sodio (1 en 250) y mezclar. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml y proceder según se indica en *Preparación muestra*, comenzando donde dice "*agregar 2 ml de solución de nitrato de potasio (1 en 100)... "*.

Preparación muestra - Transferir 10 ml de muestra a un matraz aforado de 25 ml, agregar 2 ml de solución de nitrato de potasio (1 en 100) y 10 ml de solución reguladora alcalina de borato pH 9,2 (ver *Soluciones reguladoras* en *Reactivos y Soluciones*) y ajustar a pH 9,2, si fuera necesario, con ácido nítrico 2 N. Agregar 1,5 ml de una solución de gelatina (1 en 1.000) recientemente preparada, completar a volumen con solución reguladora alcalina de borato pH 9,2 y mezclar.

Procedimiento (ver *700. Polarografía*) - Transferir una porción de *Preparación muestra* a la celda polarográfica y desairear mediante el burbujeo de nitrógeno en la solución durante 15 minutos. Insertar el electrodo capilar de mercurio de un polarógrafo apropiado y registrar el polarograma de -0,6 a -1,5 voltios contra un electrodo de calomel saturado. Determinar la corriente de difusión de la *Preparación muestra*, $(i_d)_D$ como la diferencia entre la corriente residual y la corriente limitante. En forma similar y en sucesión inmediata determinar la corriente de difusión, $(i_d)_E$ de la *Preparación estándar*. Calcular la cantidad, en mg, de nitrato fenilmercúrico ($C_6H_5HgNO_3$) en cada ml de muestra tomada, por la fórmula siguiente:

$$2{,}5C\left[(i_d)_D/(i_d)_E\right]$$

en la cual C es la concentración, en µg por ml de nitrato fenilmercúrico en la *Preparación estándar* y los otros términos son los definidos anteriormente.

Tiomersal

Preparación estándar - En el día del ensayo, transferir aproximadamente 25 mg de tiomersal, exactamente pesados, a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con agua y mezclar. [NOTA: proteger esta solución de la luz.] Transferir 15 ml de esta solución a un matraz aforado de 25 ml, agregar 1,5 ml de solución de gelatina (1 en 1.000), completar a volumen con solución de nitrato de potasio (1 en 100) y mezclar.

Preparación muestra - Transferir 15 ml de muestra a un matraz aforado de 25 ml, agregar 1,5 ml de solución de gelatina (1 en 1000), completar a volumen con solución de nitrato de potasio (1 en 100) y mezclar.

Procedimiento (ver *700. Polarografía*) - Transferir una porción de *Preparación muestra* a una celda polarográfica y desairear mediante el burbujeo de nitrógeno en la solución durante 15 minutos. Insertar el electrodo capilar de mercurio de un polarógrafo apropiado y registrar el polarograma de -0,2 a -1,4 voltios contra electrodo de calomel saturado. Determinar la corriente de difusión, $(i_d)_D$ como la diferencia entre la corriente residual y la corriente limitante. En forma similar y en sucesión inmediata determinar la corriente de difusión $(i_d)_E$ de la *Preparación estándar*. Calcular la cantidad, en mg, de tiomersal ($C_0H_9HgNaO_2S$) en cada ml de muestra tomada, por la fórmula siguiente:

$$1{,}667C\left[(i_d)_D/(i_d)_E\right]$$

en la cual C es la concentración, en mg por ml, de tiomersal en la *Preparación estándar* y los otros términos son los definidos anteriormente.

Actualización parcial

90. CONTROL HIGIÉNICO DE PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES

En este capítulo se especifican los ensayos necesarios para estimar el número de microorganismos aerobios viables presentes y para determinar la ausencia de ciertas especies microbianas en cualquier tipo de materia prima o producto farmacéutico.

A menos que se especifique de otro modo, el término *incubar* implica colocar el recipiente en aire termostáticamente controlado a una temperatura entre 30 y 35 °C durante un período de 24 a 48 horas.

Ensayos preliminares

La validez de los resultados de los ensayos incluidos en este capítulo depende, en gran medida, de que se demuestre apropiadamente que las muestras sometidas a las condiciones del ensayo no inhiben la multiplicación de los microorganismos que pudieran estar presentes.

Efectividad de los medios de cultivo y validez del método de recuento - Diluir, de acuerdo a la técnica a validar, la muestra en *Solución reguladora de fosfato pH 7,2*. Agregar separadamente diluciones de cultivos de 24 horas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* de modo que, en las placas de recuento, siguiendo el método en estudio, el número de ufc hallado sea entre 30 y 300. Controlar el método de recuento, siguiendo el procedimiento correspondiente, en presencia y ausencia de la muestra a ensayar. El recuento de los microorganismos ensayados con la muestra no debe diferir en más de un factor de 5 con respecto al valor obtenido en ausencia de la misma.

Propiedades nutritivas y selectivas de los medios y validez del ensayo para los microorganismos especificados - Inocular separadamente las muestras diluidas del producto a ensayar con cultivos viables de *Staphylococcus aureus, Escherichia, coli, Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella*. Agregar 1 ml de una dilución no menor de 10^{-3} de un cultivo de 24 horas del microorganismo en *Solución reguladora de fosfato pH 7,2*, Caldo Digerido de Caseína-Soja o Caldo Lactosado, a la primera dilución del producto a ensayar y seguir el procedimiento seleccionado. La ausencia de crecimiento de alguno de los microorganismos ensayados en el medio correspondiente indica una inhibición del desarrollo por parte del producto y requiere una modificación en el procedimiento a través de: (1) un aumento en el volumen del diluyente manteniéndose la misma cantidad del material a ensayar; (2) la incorporación de una cantidad suficiente de un agente inactivante apropiado en el diluyente, como por ej., lecitina de soja al 0,5 % y/o Polisorbato 20 al 4,0 %; (3) una combinación de las modificaciones (1) y (2) a fin de favorecer el desarrollo del inóculo.

Alternativamente, se puede repetir el ensayo anteriormente descripto empleando Caldo Digerido de Caseína-Soja-Polisorbato 20 para neutralizar conservantes u otros agentes antimicrobianos presentes en el producto a ensayar.

Si a pesar de la incorporación de agentes inactivantes apropiados y de un aumento considerable del volumen del diluyente, aun no fuera posible recuperar los cultivos viables o cuando el producto no resulta apropiado para el empleo del *Método de filtración por membrana* (ver *370. Ensayos de esterilidad*), se podrá asumir que la falla en no aislar los microorganismos inoculados es atribuible a las propiedades inhibitorias del producto. Esta información indica que es probable que el producto no se contamine con los microorganismos ensayados. En estos casos se debe continuar efectuando ensayos con el fin de establecer el espectro de inhibición y la actividad bactericida del producto.

Solución reguladora y medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden prepararse según se indica a continuación o pueden emplearse medios de cultivo deshidratados que al ser reconstituidos según las indicaciones del elaborador, produzcan medios comparables a los obtenidos por las fórmulas que aquí se indican. Determinar el pH a 25 ± 2 °C.

Al preparar el medio de cultivo con las fórmulas aquí indicadas, se deben disolver los sólidos solubles en agua, empleando calor si fuera necesario, para obtener la disolución total y agregar soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio en cantidades suficientes hasta alcanzar el pH deseado.

Si en una fórmula se indica agar, emplear uno con un contenido de humedad menor o igual a 15 %. Cuando se indica agua, emplear agua purificada.

Solución reguladora de fosfato pH 7,2 - Transferir 34 g de fosfato monobásico de potasio a un matraz aforado de 1 litro y disolver en

aproximadamente 500 ml de agua. Agregar aproximadamente 175 ml de hidróxido de sodio (SR) para ajustar a pH 7,2 ± 0,1, completar a volumen con agua y mezclar. Fraccionar y esterilizar. Almacenar en un ambiente refrigerado. Al momento de uso, diluir esta solución con agua en una proporción de 1 en 800 y esterilizar.

MEDIOS DE CULTIVO

A menos que se especifique de otro modo, los medios se deben esterilizar en autoclave. El tiempo de exposición dependerá del volumen a esterilizar.

I.Caldo Digerido de Caseína-Soja-Polisorbato 20

Digerido pancreático de caseína ……..	20,0 g
Lecitina de soja ……...	5,0 g
Polisorbato 20 ……..	40 ml
Agua ……	960 ml

Disolver el digerido pancreático de caseína y la lecitina de soja en el agua, calentando en un baño termostatizado, a una temperatura entre 48 y 50 °C, durante aproximadamente 30 minutos, hasta lograr la disolución. Agregar 40 ml de polisorbato 20, mezclar y fraccionar.

II. Agar Digerido de Caseína-Soja

Digerido pancreático de caseína ……..	15,0 g
Digerido papaínico de harina de soja ..	5,0 g
Cloruro de sodio ……..	5,0 g
Agar …….	15,0 g
Agua ……	1.000 ml

pH después de la esterilización: 7,3 ± 0,2.

III. Caldo Digerido de Caseína-Soja

Preparar según se indica para *Caldo Digerido de Caseína-Soja* en *<370>. Ensayos de esterilidad.*

IV. Agar Manitol-Sal

Digerido pancreático de caseína ……..	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal ….....	5,0 g
Extracto de carne vacuna …….	1,0 g
D-Manitol ……	10,0 g
Cloruro de sodio ……..	75,0 g
Agar …….	15,0 g
Rojo de fenol ……...	0,025 g
Agua ……	1.000 ml

Mezclar y luego calentar, agitando frecuentemente. Calentar a ebullición durante 1 minuto hasta lograr disolución.

pH después de la esterilización: 7,4 ± 0,2.

V. Agar Baird-Parker

Digerido pancreático de caseína ……..…	10,0 g
Extracto de carne vacuna ……	5,0 g
Extracto de levadura ……	1,0 g
Cloruro de litio ……	5,0 g
Agar ……..	20,0 g
Glicina ……..	12,0 g
Piruvato de sodio ……..	10,0 g
Agua ……	950 ml

Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Esterilizar y dejar enfriar a una temperatura entre 45 y 50 °C. Agregar 10 ml de solución estéril de telurito de potasio (1 en 100) y 50 ml de emulsión de yema de huevo. Mezclar suavemente evitando la formación de espuma, hasta obtener una mezcla homogénea y transferir a las placas. [NOTA: para preparar la emulsión de yema de huevo desinfectar la totalidad de la superficie de las cáscaras de los huevos. Romper las cáscaras asépticamente, separar las yemas, en forma intacta y colocarlas en una probeta estéril. Agregar Solución fisiológica (SR) estéril hasta obtener una proporción de yema/solución fisiológica de 3 a 7. Transferir a un vaso estéril de una mezcladora y mezclar a alta velocidad durante 5 segundos.]

pH después de la esterilización:6,8 ± 0,2.

VI. Agar Vogel-Johnson

Digerido pancreático de caseína ……..	10,0 g
Extracto de levadura ……	5,0 g
Manitol ……	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio …….	5,0 g
Cloruro de litio ……	5,0 g
Glicina …….	10,0 g
Agar …….	16,0 g
Rojo de fenol ……...	25,0 g
Agua ……	1.000 ml

Calentar a ebullición la solución constituida por todos los componentes durante 1 minuto. Esterilizar, enfriar a una temperatura entre 45 y 50 °C y agregar 20 ml de solución estéril de telurio de potasio (1 en 100).

pH después de la esterilización:7,2 ± 0,2.

VII. Agar Cetrimida

Digerido pancreático de gelatina …….	20,0 g
Cloruro de magnesio ……	1,4 g
Sulfato de potasio ……	10,0 g
Agar …….	13,6 g
Bromuro de cetiltrimetilamonio (Cetrimida) ……..	0,3 g
Glicerina ……..	10,0 ml
Agua ……	1.000 ml

Disolver los componentes sólidos en agua y agregar la glicerina. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente para facilitar la disolución.

pH después de la esterilización: 7,2 ± 0,2.

VIII. Agar *Pseudomonas* para la Detección de Fluorescina

Digerido pancreático de caseína ……..	10,0 g
Digerido péptico de tejido animal …..	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio anhidro ……	1,5 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 . 7H_2O$)	1,5 g
Glicerina	10,0 ml
Agar	15,0 g
Agua	1.000 ml

Disolver los componentes sólidos en agua y agregar la glicerina. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente para facilitar la disolución.

pH después de la esterilización: 7,2 ± 0,2.

IX. Agar *Pseudomonas* para la Detección de Piocianina

Digerido pancreático de gelatina …….	20,0 g
Cloruro de magnesio anhidro ……..	1,4 g
Sulfato de potasio anhidro ……...	10,0 g
Agar …….	15,0 g
Glicerina ……..	10,0 ml
Agua ……	1.000 ml

Disolver los componentes sólidos en agua y agregar la glicerina. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente para facilitar la disolución.

pH después de la esterilización: 7,2 ± 0,2.

X. Caldo Lactosado

Extracto de carne vacuna …….	3,0 g
Digerido pancreático de gelatina …….	5,0 g
Lactosa …….	5,0 g
Agua ……	1.000 ml

Enfriar lo más rápidamente posible después de la esterilización.

pH después de la esterilización: 6,9 ± 0,2.

XI. Caldo Selenito-Cistina

Digerido pancreático de caseína ……..	5,0 g
Lactosa …….	4,0 g
Fosfato de sodio ……...	10,0 g
Selenito ácido de sodio ……	4,0 g
L-Cistina ……..	10,0 mg
Agua ……	1.000 ml

Mezclar y calentar hasta disolución. Calentar a vapor fluente durante 15 minutos. NO ESTERILIZAR.

pH final: 7,0 ± 0,2.

XII. Caldo Tetrationato

Digerido pancreático de caseína ……..	2,5 g
Digerido péptico de tejido animal …….	2,5 g
Sales biliares ……	1,0 g
Carbonato de calcio …….	10,0 g
Tiosulfato de sodio …….....	30,0 g
Agua ……	1.000 ml

Calentar la solución constituida por todos los componentes da ebullición. NO ESTERILIZAR. En el día de su uso, agregar una solución de 5 g de ioduro de potasio y 6 g de yodo en 20 ml de agua.

XIII. Agar Verde Brillante

Extracto de levadura ……	3,0 g
Digerido péptico de tejido animal ……..….	5,0 g
Digerido pancreático de caseína ……..	5,0 g
Lactosa …….	10,0 g
Cloruro de sodio ……..	5,0 g
Sacarosa ……...	10,0 g
Rojo de fenol ……...	80 mg
Agar …….	20,0 g
Verde brillante …….	12,5 mg
Agua ……	1.000 ml

Calentar a ebullición la solución constituida por todos los sólidos durante 1 minuto. Antes de su uso, esterilizar, fundir el medio y verter en las placas de petri. Dejar enfriar.

pH después de la esterilización: 6,9 ± 0,2.

XIV. Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato

Xilosa ……...	3,5 g
L-Lisina ……...	5,0 g
Lactosa …….	7,5 g
Sacarosa ……...	7,5 g
Cloruro de sodio ……..	5,0 g
Extracto de levadura ……	3,0 g
Rojo de fenol ……...	80 mg
Agar …….	13,5 g
Desoxicolato de sodio ……..	2,5 g
Tiosulfato de sodio ……..	6,8 g
Citrato amónico férrico ……	800 mg
Agua ……	1.000 ml

Calentar la mezcla de sólidos con agua, agitando por rotación hasta llegar al punto de ebullición. NO SOBRECALENTAR NI ESTERILIZAR. Transferir de inmediato a un baño de agua a 50 °C y verter en las placas tan pronto como el medio se haya enfriado.

pH final: 7,4 ± 0,2.

XV. Agar Sulfito de Bismuto

Extracto de carne vacuna …….	5,0 g
Digerido pancreático de caseína ……..	5,0 g
Digerido péptico de tejido animal ……..	5,0 g

Dextrosa ……...	5,0 g
Fosfato de sodio ……...	4,0 g
Sulfato ferroso …….	300 mg
Indicador de sulfito de bismuto ……...	8,0 g
Agar …….	20,0 g
Verde brillante …….	25 mg
Agua ……	1.000 ml

Calentar la mezcla de sólidos con agua, agitando por rotación hasta llegar al punto de ebullición. NO SOBRECALENTAR NI ESTERILIZAR. Transferir de inmediato a un baño de agua a 50 °C y verter en las placas tan pronto como el medio se haya enfriado.

pH final: 7,6 ± 0,2.

XVI. Agar Triple Azúcar-Hierro

Digerido pancreático de caseína ……..	10,0 g
Digerido pancreático de tejido animal …….	10,0 g
Lactosa …….	10,0 g
Sacarosa ……...	10,0 g
Dextrosa ……...	1,0 g
Sulfato ferroso amónico ……..	200 mg
Cloruro de sodio ……..	5,0 g
Tiosulfato de sodio ……..	200 mg
Agar …….	13,0 g
Rojo de fenol ……...	25 mg
Agua ……	1.000 ml

pH después de esterilización: 7,3 ± 0,2.

XVII. Agar Mac Conkey

Digerido pancreático de gelatina …….	17,0 g
Digerido pancreático de caseína ……..	1,5 g
Digerido péptico de tejido animal …….	1,5 g
Lactosa …….	10,0 g
Mezcla de sales biliares ……...	1,5 g
Cloruro de sodio ……..	5,0 g
Agar …….	13,5 g
Rojo neutro ……..	30 mg
Cristal violeta ……...	1,0 mg
Agua ……	1.000 ml

Calentar la mezcla de todos los componentes y el agua hasta ebullición y seguir calentando durante 1 minuto para facilitar la disolución.

pH después de la esterilización: 7,1 ± 0,2.

XVIII. Agar Levine Eosina-Azul de Metileno

Digerido pancreático de gelatina …….	10,0 g
Fosfato dibásico de potasio …….	2,0 g
Agar …….	15,0 g
Lactosa …….	10,0 g
Eosina ……..	400 mg
Azul de metileno ……..	65 mg
Agua ……	1.000 ml

Disolver mediante calentamiento el digerido pancreático de gelatina, el fosfato dibásico de potasio y el agar en el agua y dejar enfriar. Inmediatamente antes de usar, fundir el gel de agar mediante calentamiento y agregar, por cada 100 ml de la solución de agar fundido, 5 ml de solución de lactosa (1 en 5), 2 ml de eosina (1 en 50) y 2 ml de la solución de azul de metileno (1 en 300). Mezclar. [NOTA: el medio final puede no ser transparente].

pH después de la esterilización: 7,1 ± 0,2.

XIX. Agar Sabouraud-Dextrosa

Dextrosa …….	40,0 g
Mezcla de partes iguales de digerido péptico de tejido animal y digerido pancreático de caseína……...	10,0 g
Agar ……	15,0 g
Agua ……...	1.000 ml

Mezclar y calentar a ebullición para facilitar la disolución.

pH después de la esterilización:5,6 ± 0,2.

XX. Agar Papa-Dextrosa

Cocer 300 g de papas peladas, cortadas en rodajas, en 500 ml de agua. Filtrar a través de gasa, agregar agua en cantidad suficiente para obtener 1.000 ml y agregar:

Agar …….	15,0 g
Glucosa ……	20,0 g

Disolver por calentamiento y esterilizar.

pH después de la esterilización:5,6 ± 0,2.

Inmediatamente antes de verter en las placas, ajustar el medio fundido y enfriado a 45 °C con solución estéril de ácido tartárico (1 en 10) a pH 3,5 ± 0,1.

No volver a calentar el medio de pH 3,5.

XXI. Agar DRBC (Dicloran-Rosa de bengala-Cloranfenicol)

Glucosa ……...	10,0 g
Peptona ……...	5,0 g
Fosfato dibásico de potasio ……	1,0 g
Sulfato de magnesio ($mgSO_4$. 7 H_2O) ……	0,5 g
Cloruro de diclorobenzalconio (Dicloran) ……...	2 mg
Agar ……	15,0 g
Cloranfenicol ……..	100 mg
Rosa de bengala ……..	25,0 mg
Agua ……...	1.000 ml

Disolver los componentes sólidos en agua. Calentar a ebullición durante 1 minuto, agitando frecuentemente, para facilitar la disolución.

pH después de la esterilización: 5,6 ± 0,2.

XXII. Agar Cristal Violeta-Rojo Neutro-Bilis-Glucosa

Peptona de carne ……..	7,0 g
Extracto de levadura ……	3,0 g
Cloruro de sodio ……..	5,0 g
Glucosa ……	10,0 g
Mezcla de sales biliares ……...	1,5 g
Rojo Neutro …….	0,03 g
Cristal violeta ……...	0,002 g
Agar …….	13,0 g
Agua ……	1.000 ml

Disolver y calentar durante 30 minutos a vapor fluente. No esterilizar en autoclave.

pH final:7,3 ± 0,1.

XXIII. Caldo de Enriquecimiento de Mossel para Enterobacterias

Digerido pancreático de gelatina …….	10,0 g
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$. H_2O) …….	5,0 g
Bilis de buey deshidratada ……...	20,0 g
Fosfato monobásico de potasio ……...	2,0 g
Fosfato dibásico de potasio dihidratado ……..	8,0 g
Verde brillante …….	15 mg
Agua ……	1.000 ml

Ajustar el pH de manera que, después del calentamiento, sea de 7,2 ± 0,2. Calentar a 100 °C durante 30 minutos y enfriar inmediatamente.

XXIV. Medio Tioglicolato

Preparar según se indica para *Medio Tioglcolato* en *<370>. Ensayos de esterilidad*.

XXV. Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiacina

Peptona de caseína	15,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Citrato férrico	0,5 g
Sulfito de sodio	0,5 g
Polimixina B sulfato	0,01 g
Sulfadiacina sódica	0,12 g
Agar	13,9 g
Agua	1.000 ml

Disolver por calentamiento y esterilizar en autoclave.

pH después de la esterilización: 7,0 ± 0,2.

MUESTREO

Tomar porciones de 10 ml o 10 g para preparar la muestra a ensayar.

PROCEDIMIENTO

Preparar la muestra a ensayar mediante un tratamiento que se ajuste a sus características físicas y que no altere el número y tipo de microorganismos originalmente presentes, a fin de obtener una solución o suspensión apropiada.

En el caso de sólidos que no se disuelven por completo, reducir la muestra a polvo moderadamente fino. Suspender en el vehículo especificado y proceder según se indica en *Recuento de aerobios viables*, *Ensayo para Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa y Ensayo para Salmonella spp.* y *Escherichia coli.*

En el caso de líquidos, soluciones verdaderas, suspensiones en agua o en un vehículo hidroalcohólico que contenga menos de 30 % de alcohol y en el caso de un sólido que se disuelve en *Solución reguladora de fosfato pH 7,2* o en el medio especificado, proceder según se indica en *Recuento de aerobios viables*, *Ensayo para Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa* y *en Ensayo para Salmonella spp. y Escherichia coli.*

En el caso de líquidos no miscibles en agua, como ungüentos, cremas y ceras, preparar una suspensión con la ayuda de una cantidad mínima de un agente emulsionante estéril apropiado (como por ej., un polisorbato), mezclar y calentar a una temperatura menor o igual a 45 °C, si fuera necesario, y proceder según se indica en *Recuento de aerobios viables*, *Ensayo para Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa* y en *Ensayo para Salmonella spp. y Escherichia coli*.

En el caso de aerosoles líquidos, enfriar el recipiente en una mezcla de hielo seco y alcohol durante aproximadamente 1 hora. Cortar el recipiente, dejar que alcance la temperatura ambiente. Dejar evaporar el propelente o calentar suavemente, si fuera posible, y transferir la cantidad de producto a ensayar siguiendo alguno de los procedimientos especificados anteriormente. En caso que no fuera posible obtener 10,0 g o 10,00 ml de muestra, a partir de diez aerosoles, transferir el contenido total de diez envases enfriados al medio de cultivo, dejar evaporar el propelente y realizar el ensayo sobre los residuos. Si los resultados de los ensayos resultaran dudosos o no concluyentes, repetir el ensayo sobre veinte envases adicionales.

Recuento de aerobios viables

En el caso de muestras que sean lo suficientemente solubles o translúcidas para permitir el *Procedimiento en placa*, emplear dicho método. En caso contrario, emplear el *Procedimiento en tubo*. Con cualquiera de los dos métodos, disolver o suspender 10,0 g de muestra, si fuera sólida, o 10,0 ml, exactamente medidos, si fuera un líquido, en *Solución reguladora de fosfato pH 7,2*, Caldo Digerido de Caseína-Soja o Caldo

Digerido de Caseína-Soja-Polisorbato 20 para obtener 100 ml. Para muestras que no pudieran ser pipeteadas a esta dilución inicial de 1:10, diluirlas hasta obtener una suspensión que pueda ser pipeteada, como por ej., 1:50 ó 1:100, etc. Realizar el ensayo de ausencia de propiedades inhibidoras según se indica en *Ensayos preliminares* antes de la determinación del *Recuento de aerobios viables*. Las diluciones así preparadas no deben dejarse más de 1 hora antes de proseguir con el ensayo.

Procedimiento en placa - Realizar una dilución, si fuera necesario, de modo que 1 ml contenga entre 30 y 300 ufc. Transferir 1 ml de la dilución final a cada una de dos placas de Petri estériles. Agregar rápidamente a cada placa entre 15 y 20 ml del Agar Digerido de Caseína-Soja previamente fundido y enfriado a 45 °C. Tapar las placas de Petri, homogeneizar la muestra con el agar por rotación de las placas y dejar solidificar a temperatura ambiente. Invertir las placas de Petri e incubar durante 48 a 72 horas. Luego de la incubación, examinar las placas para ver si hubo desarrollo. Contar el número de colonias y expresar el promedio para las dos placas en términos del número de unidades formadoras de colonias por g (ufc/g) o por ml de muestra (ufc/ml). Si no se detectan colonias en las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como menos de 10 ufc por g o por ml de muestra.

Procedimiento en tubo - Agregar a cada uno de catorce tubos de ensayo de tamaño similar, 9,0 ml de Caldo Digerido de Caseína-Soja estéril. Distribuir doce de los tubos en cuatro grupos de tres tubos cada uno. El grupo de los tres tubos restantes servirá de control. Transferir 1 ml de la solución o suspensión de la muestra a cada uno de los tres tubos de un grupo ("100") y a un cuarto tubo (A) y mezclar. Transferir 1 ml del contenido del tubo A, al tubo restante (B) no incluido en ningún grupo y mezclar. Estos dos tubos contienen 100 mg (ó 100 µl) y 10 mg (ó 10 µl) de la muestra, respectivamente. Transferir 1 ml del contenido del tubo a cada uno de los tres tubos del segundo grupo ("10") y 1 ml del contenido del tubo B a cada uno de los tubos del tercer grupo ("1"). Descartar el contenido remanente de los tubos A y B. Tapar bien e incubar todos los tubos. Luego del período de incubación, examinar los tubos para detectar desarrollo bacteriano: los tres tubos controles deben permanecer transparentes y los tubos que contienen la muestra deben compararse con la *Tabla 1*.

Ensayo para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

A un volumen de la dilución preparada en *Recuento de aerobios viables*, equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Caldo Digerido de Caseína-Soja para obtener 100 ml, mezclar e incubar. Examinar el medio para detectar desarrollo bacteriano y, si lo hubiera, inocular con un ansa la superficie de Agar Vogel-Johnson (o Agar Baird-Parker o Agar Manitol-Sal) y de Agar Cetrimida. Tapar, invertir las placas e incubar. Si ninguna de las placas contiene colonias con las características descritas en la *Tabla 2* y en la *Tabla 3* para los medios empleados, la muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de *Staphylococcus aureus* y de *Pseudomonas aeruginosa* por gramo o mililitro.

Ensayo para Staphylococcus aureus - Transferir a tubos individuales 0,5 ml de plasma de mamífero, preferentemente conejo o caballo, con o sin aditivos apropiados. Con la ayuda de un ansa de inoculación, transferir a sendos tubos una porción representativa de cada una de las colonias sospechosas de la superficie del Agar Vogel-Johnson (o Agar Baird-Parker o Agar Manitol-Sal), catalasa positivas. Incubar en un baño de agua a 37°C, durante 3 horas y observar. Posteriormente y a intervalos apropiados, observar hasta que hayan transcurrido 24 horas. Efectuar, en paralelo con la muestra, centro positivos y negativos. La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de *Staphylococcus aureus* por gramo o mililitro si no se observa ningún grado de coagulación. La presencia dé *Staphylococcus aureus* puede ser confirmada por otros ensayos bioquímicos apropiados.

Ensayo para Pseudomonas aeruginosa - Con la ayuda de un ansa de inoculación, transferir una porción representativa de cada una de las colonias sospechosas de la superficie del Agar Cetrimida a la superficie de Agar *Pseudomonas* para la Detección de Fluorescina y de Agar *Pseudomonas* para la Detección de Piocianina. Tapar e invertir los medios inoculados e incubar a 35 ± 2 °C durante no menos de 3 días. Examinar las superficies inoculadas bajo luz ultravioleta y determinar si las colonias poseen las características descriptas en la *Tabla 3.*

Confirmar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en cualquier colonia sospechosa que se haya desarrollado en uno o más de los medios, por ensayos bioquímicos apropiados. Transferir las colonias a tiras o discos de papel de filtro previamente impregnados con diclorhidrato de *N*,*N*-dimetil-*p*-fenilendiamina: la muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* por gramo o mililitro si no desarrolla un color rosado, que más tarde se

torna púrpura. La presencia de *Pseudomonas aeruginosa* puede ser confirmada por otros ensayos bioquímicos apropiados.

Ensayo para *Salmonella spp*. y *Escherichia coli*

A un volumen de la dilución preparada en *Recuento de aerobios viables*, equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Caldo Lactosado para obtener 100 ml, mezclar e incubar. Observar el medio. Si se detecta desarrollo bacteriano mezclar suavemente y transferir porciones de 1 ml a tubos que contengan respectivamente, 10 ml de Caldo Selenito-Cistina y 10 ml Caldo Tetrationato, mezclar e incubar durante un período de 12 a 24 horas (conservar el Caldo Lactosado remanente).

Ensayo para Salmonella spp. - Mediante el empleo de un ansa de inoculación, transferir porciones de los medios de selenito-cistina y de tetrationato, a las superficies de Agar Verde Brillante, Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato y Agar Sulfito de Bismuto. Tapar, invertir las placas e incubar. La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de *Salmonella spp* por gramo o mililitro si no se observa el desarrollo de colonias con las características descritas en la *Tabla 4.*

Si al menos en uno de los medios se encuentran colonias de bacilos Gram negativos que coincidan con las descriptas en la *Tabla 4*, realizar un ensayo adicional, transfiriendo individualmente cada una de las colonias sospechosas, mediante un ansa de inoculación a un tubo que contenga Agar Triple Azúcar-Hierro solidificado con una superficie inclinada y un fondo, inoculándose la superficie primero y luego el fondo por punción. Incubar los tubos. Si no se observara reacción alcalina (color rojo) sobre la superficie y ácida (color amarillo) en el fondo (con o sin ennegrecimiento concomitante del fondo, producido por la formación de ácido sulfhídrico), la muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia del género *Salmonella*. La presencia o ausencia de *Salmonella* puede ser confirmada por ensayos bioquímicos apropiados.

Ensayo para escherichia coli - Con la ayuda de un ansa de inoculación, transferir una porción del Caldo Lactosado remanente sobre la superficie de Agar Mac Conkey. Tapar, invertir e incubar las placas.

Si se observaran colonias como las descriptas en la *Tabla 5*, realizar un ensayo adicional transfiriendo individualmente las colonias sospechosas, con la ayuda de un ansa de inoculación, a la superficie de Agar Levine Eosina-Azul de Metileno. Tapar, invertir e incubar las placas. La muestra cumple con los requisitos del ensayo para la ausencia de *Escherichia coli* por gramo o mililitro si, ninguna de las colonias observadas presenta un brillo metálico característico frente a la luz reflejada y un aspecto negro azulado frente a la luz transmitida. La presencia de *Escherichia coli* puede ser confirmada por ensayos bioquímicos apropiados.

Ensayo para anaerobios Sulfito-reductores

A un volumen de la dilución preparada en *Recuento de aerobios viables*, equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Medio Tioglicolato previamente calentado durante 10 minutos en un baño de vapor y enfriado, adicionado de azida sódica al 0,03 %, hasta obtener 100 ml. Cubrir la superficie con una mezcla estéril de vaselina y parafina. [NOTA: la mezcla estéril de vaselina y parafina se prepara fundiendo 250 g de parafina conjuntamente con 750 g de vaselina, mezclando bien, repartiendo en tubos y esterilizando en autoclave]. El medio inoculado y cubierto con la capa de vaselina-parafina se incuba entre 48 y 72 horas a 35 °C. Si se observa desarrollo microbiano, transferir 1 ml a un tubo estéril de no más de 16 mm de diámetro exterior y no menos de 200 mm de largo. Agregar por las paredes, Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiacina, previamente fundido y enfriado a 40 °C, hasta no más de 1 cm del borde superior del tubo. Cubrir con la mezcla de vaselina-parafina e incubar entre 5 y 7 días a 35 °C, observando diariamente. La muestra cumple con el ensayo de ausencia de microorganismos anaerobios sulfito-reductores por gramo o mililitro si no se observa el desarrollo de colonias negras.

Gérmenes revivificables

A un volumen de la dilución preparada en *Recuento de aerobios viables*, equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Caldo Digerido de Caseína-Soja para obtener 100 ml. Incubar durante 5 días entre 25 y 28 °C. A otro volumen de la dilución preparada en *Recuento de aerobios viables*, equivalente a 1 g o 1 ml de producto, agregar Medio Tioglicolato hasta obtener 100 ml. Incubar entre 48 y 72 horas a 35 °C. Observar ambos medios. La muestra cumple con los requisitos del ensayo para ausencia de gérmenes revivificables en un gramo o mililitro si no se observa desarrollo microbiano.

Recuento de *Enterobacteriaceae*

Procedimiento en placa - Proceder según se indica para *Recuento de aerobios viables* pero emplear Agar Cristal Violeta-Rojo-Neutro-Bilis-Glucosa e incubar entre 48 y 72 horas. Luego de la incubación observar las placas para ver si

hubo crecimiento. Contar el número de colonias rojas con halo de precipitación rojizo, de bacilos Gram negativos y expresar el promedio para las dos placas en términos del número de ufc de *Enterobacteriaceae* por g o ml de muestra. Si no se observan colonias características en las placas que representan la dilución inicial (1:10) de la muestra, expresar los resultados como menos de 10 ufc por g o ml de muestra.

Procedimiento en tubo - Inocular cantidades apropiadas de Caldo de Mossel para Enriquecimiento de Enterobacterias con la muestra preparada según se indica en *Procedimiento* o con diluciones de la misma que contengan respectivamente 1-0; 0,1 y 0,01 g o 1,0, 0,1 y 0,01 ml. Incubar. A partir de cada cultivo positivo subcultivar sobre Agar Cristal Violeta-Rojo Neutro-Bilis-Glucosa. Incubar entre 18 y 24 horas. La presencia de colonias rojas con halo de precipitación rojizo de bacilos Gram negativos constituye un resultado positivo. A partir de la *Tabla 6* determinar el número más probable de *Enterobacteriaceae* por g o ml de muestra.

Ensayo para Enterobacteriaceae - Disolver o suspender 10,0 g de muestra, si fuera sólida, o 10,0 ml, exactamente medidos, si fuera un líquido, en Caldo Lactosado hasta obtener 100 ml. Incubar entre 2 y 5 horas. Homogeneizar y transferir 10 ml de la muestra incubada a 90 ml de Caldo de Mossel para Enriquecimiento de Enterobacterias. Incubar entre 18 y 24 horas. Subcultivar sobre Agar Cristal Violeta-RojoNeutro-Bilis-Glucosa e incubar. La muestra cumple con el ensayo para ausencia de *Enterobacteriaceae* por gramo o mililitro si no se observa desarrollo de colonias rojas con halo de precipitación rojizo de bacilos Gram negativos o si los ensayos bioquímicos son negativos.

Recuento de hongos y levaduras

Proceder según se indica para el *Procedimiento en placa* en *Recuento de aerobios viables* pero emplear Agar Dextrosa-Sabouraud, Agar Papa-Dextrosa o Agar DRBC. Incubar las placas de Petri, durante un período de 5 a 7 días, a una temperatura entre 20 y 25 °C.

REANÁLISIS

Con el propósito de confirmar un resultado dudoso en cualquiera de los procedimientos anteriormente descriptos para el análisis de una muestra de 10 g, el ensayo puede repetirse con una muestra de 25 g. Proceder según se indica en *Procedimiento*, haciendo las modificaciones necesarias para adaptarlo a una muestra de mayor tamaño.

ASIGNACIÓN DE LÍMITES

El significado de la presencia de microorganismos en productos farmacopeicos no estériles, incluidos aquéllos con límites especificados en la monografía correspondiente, debe ser evaluado teniendo en cuenta el uso del producto, su naturaleza, el riesgo potencial para el paciente y el procesamiento.

El contenido de microorganismos en una muestra, provee un índice general del grado de contaminación e información acerca del proceso de manufactura del elaborador. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, el recuento de microorganismos en materias primas no debe ser mayor de 1.000 ufc por g o ml para aerobios viables y 100 ufc por g o ml para hongos y levaduras. En el caso de productos terminados, los valores establecidos se basan en el tipo de forma farmacéutica y su vía de administración. Los límites de contenido microbiano para productos farmacopeicos no estériles en base a su vía de administración se indican en la *Tabla 7*.

Tabla 1. Número más probable de microorganismos. Procedimiento en tubo.

Número de tubos positivos			N° más probable de microorganismos por g o ml	Límite de confianza 95 por ciento	
0,1 g	0,01 g	0,001 g			
0	0	0	< 3	-	-
0	1	0	3	< 1	17
1	0	0	3	1	21
1	0	1	7	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20	8	61
2	2	0	21	8	63

3	0	0	23	7	129
3	0	1	38	10	180
3	1	0	43	20	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	390
3	2	1	150	50	510
3	2	2	210	80	640
3	3	0	240	100	1400
3	3	1	460	200	2.400
3	3	2	1.100	300	4.800
3	3	3	> 1.100	-	-

Tabla 2. Características morfológicas de *Staphylococcus aureus* en medios selectivos.

Medio selectivo	Características morfológicas de las colonias	Coloración de Gram
Agar Vogel-Johnson	Negras rodeadas de un halo amarillo	Cocos positivos (en racimos)
Agar Manitol-Sal	Amarillas con halos amarillos	Cocos positivos (en racimos)
Agar Baird-Parker	Negras brillantes, rodeadas de halos de aclaración de 2 a 5 mm	Cocos positivos (en racimos)

Tabla 3. Características morfológicas de *Pseudomonas aeruginosa* en medios selectivos y de diagnóstico.

Medio selectivo	Características morfológicas de las colonias	Fluorescencia a la luz ultravioleta	Prueba de oxidasa	Coloración de Gram
Agar cetrimida	Generalmente verdosas	Verdosas	Positiva	Bacilos negativos
Agar Pseudomonas para la detección de Fluorescina	Generalmente incoloras o amarillentas	Amarillenta	Positiva	Bacilos negativos
Agar Pseudomonas para la detección de Piocianina	Generalmente verdosas	Azul	Positiva	Bacilos negativos

Tabla 4. Características morfológicas de *Salmonella ssp.* en medios selectivos.

Medio selectivo	Características morfológicas de las colonias
Agar Verde Brillante	Pequeñas, transparentes, incoloras o de color rosado a blanco opaco (frecuentemente circundadas por un halo de un color rosado a rojo).
Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato	Rojas, con o sin centro negro.
Agar Sulfito de Bismuto	Negras o verdes

Tabla 5. Características morfológicas de *Escherichia coli* en Agar Mac Conkey.

Coloración de Gram	Características morfológicas de las colonias
Bacilos negativos (cocco-bacilli)	Rojo ladrillo, pueden presentar un halo de bilis precipitada

Tabla 6. Número más probable de Enterobacterias.

Volumen o peso del producto			N° más probable de bacterias por g o ml de producto
1,0 g o 1,0 ml	0,1 g o 0,1 ml	0,01 g o 0,01 ml	
+	+	+	Más de 10^2
+	+	–	Menos de 10^2 y más de 10
+	–	–	Menos de 10 y más de 1
–	–	–	Menos de 1

Tabla 7. Asignación del contenido límite de microorganismos para productos farmacéuticos no estériles, según su vía de administración (Disp. ANMAT 7352/99)

Categoría	Vías de administración	Recuento de aerobios viables totales por g o ml	*Enterobacteriaceae*	Hongos y levaduras	Ausencia en 1 g o ml*
1.1	Productos para ser aplicados sobre escaras, ulceraciones o quemaduras graves	–	–	–	Gérmenes revivificables
1.2	Inhalatoria	≤ 10	–	–	*Enterobacteriaceae* *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*
2	Nasal, ótica, rectal, tópica y vaginal	$\leq 10^2$	–	–	*Enterobacteriaceae* *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*
3	Oral	$\leq 10^3$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	*Pseudomonas aeruginosa*** *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* *Salmonella* spp

* Anaerobios sulfitorreductores para productos cuyas materias primas se consideren fuentes de contaminación.
** *Pseudomonas aeruginosa* solamente para formas farmacéuticas líquidas.

100. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es un método por el cual las sustancias se separan mediante un proceso de migración diferencial en un sistema que consta de dos fases. Una fase que fluye continuamente en una dirección dada (fase móvil) y otra que permanece fija (fase estacionaria). En estos sistemas los componentes de una mezcla pueden presentar diferentes movilidades debido a diferencias en la capacidad de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o carga. Los mecanismos de separación son: adsorción, disolución y partición, filtración y permeación o tamices moleculares, intercambio iónico.

Las técnicas aplicadas mediante los distintos mecanismos-mencionados empleados en esta Farmacopea son: Cromatografía en columna, Cromatografía en papel, Cromatografía en capa delgada, Cromatografía de gases, Cromatografía líquida de alta eficacia y Cromatografía de exclusión.

La *Cromatografía de adsorción* se basa en la separación de un soluto entre la fase estacionaria constituida por un adsorbente, como por ej., alúmina activada, sílica gel y resinas de intercambio iónico y la fase móvil constituida por el solvente de elusión.

La *Cromatografía de partición* se basa en la distribución selectiva del soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil. Se clasifica en cromatografía de partición en fase normal y cromatografía de partición en fase reversa. En la cromatografía de partición en fase normal las sustancias a separar se distribuyen entre dos líquidos inmiscibles uno de los cuales es más polar, actúa como fase estacionaria y se encuentra adsorbido sobre un soporte sólido, brindando una gran superficie de contacto a la fase móvil menos polar. En la cromatografía de partición en fase reversa la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil.

El grado de partición de un compuesto dado entre las dos fases líquidas se expresa por su coeficiente de partición o de distribución y puede modificarse variando la composición de la fase móvil. En el caso de compuestos que se disocian, la distribución se puede controlar modificando, entre otras propiedades, el pH, la constante dieléctrica y la fuerza iónica.

La *Cromatografía de intercambio iónico* se emplea para separar compuestos ionizables y solubles en agua. Las fases estacionarias empleadas son generalmente resinas orgánicas sintéticas. Las resinas de intercambio catiónico contienen sitios activos con carga negativa y se emplean para separar compuestos básicos, como por ej., las aminas. Las resinas de intercambio aniónico tienen sitios activos con carga positiva para la separación de compuestos ácidos, como por ej., fosfatos, sulfonatos o carboxilatos. Los compuestos iónicos o ionizables, solubles en agua, son atraídos a las resinas y las diferencias en la afinidad producen la separación cromatográfica. El pH de la fase móvil, la temperatura, el tipo de ión, la concentración iónica y los modificadores orgánicos afectan el equilibrio; estas variables pueden ajustarse para obtener el grado de separación deseado.

La *Cromatografía por tamices moleculares* se basa en el intercambio repetido de los compuestos con la fase móvil y con la fase líquida estacionaria que se encuentra dentro de los poros del material de relleno.

Empleo de Sustancias de referencia en ensayos de identificación - En Cromatografía en papel y en Cromatografía en capa delgada, la relación entre la distancia recorrida por una sustancia y la distancia recorrida por el frente de la fase móvil, se denomina relación de frente, R_f, de la sustancia. La relación entre la distancia recorrida por una sustancia y la distancia recorrida por una *Sustancia de referencia*, se denomina R_E de la sustancia.

En el caso de la Cromatografía en papel se han observado diferencias en el valor de R_f cuando los cromatogramas se desarrollan en dirección paralela a las fibras de papel en comparación con los desarrollados en forma perpendicular a dicha dirección. En consecuencia, la orientación de las fibras del papel en lo que se refiere al flujo de la fase móvil debe ser la misma para una serie de cromatogramas. [NOTA: por lo general, el fabricante indica el sentido de las fibras en los envases de papel para Cromatografía].

Los valores absolutos de R_f, son difíciles de establecer, ya que varían con las condiciones experimentales por lo tanto se logra una mejor identificación cuando se emplea una muestra de la sustancia a ensayar como *Sustancia de referencia*. Para este fin se preparan soluciones de la muestra, la *Sustancia de referencia* y una mezcla de partes iguales de ambas y se aplican sobre una línea paralela a uno de los bordes de la placa cromatográfica u hoja de papel. Cada aplicación contiene aproximadamente la misma cantidad, en peso, de la muestra y la *Sustancia de referencia.* Si la misma y la *Sustancia de referencia* son idénticas, todos los cromatogramas deben

coincidir en color y valor de R_f, y el cromatograma de la mezcla debe mostrar una única mancha.

En Cromatografía en columna, Cromatografía en papel y Cromatografía en capa delgada, las sustancias pueden ser localizadas por: (a) observación directa con luz visible o luz ultravioleta, si las sustancias poseen color o producen fluorescencia; (b) observación con luz visible o ultravioleta, después de agregar un reactivo que reaccione con las sustancias separadas; (c) mediante un contador Geiger-Müller o con técnica autorradiográfica, cuando se trabaja con sustancias radiactivas o (d) por estimulación o inhibición del desarrollo microbiano, colocando trozos de papel que contienen las sustancias separadas en medios de cultivo apropiados.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

La Cromatografía en columna se emplea para la separación de sustancias en escala preparativa.

Cromatografía de adsorción

Preparación de la columna - Emplear un tubo cromatográfico, cilíndrico, de vidrio o del material especificado en la monografía correspondiente, generalmente de 10 a 30 mm de diámetro interno y de 150 a 400 mm de largo. En su extremo inferior, el tubo se angosta formando un tubo de salida que generalmente posee un diámetro interno de 3 a 6 mm, pudiendo incluir un robinete para el control exacto del caudal. Generalmente se emplea una varilla de vidrio u otro material para colocar un trozo de lana de vidrio o algodón, en la base del tubo, y si fuera necesario, compactar el adsorbente o una suspensión del mismo uniformemente dentro del tubo. En algunos casos, en la base del tubo se encuentra soldado un disco de vidrio poroso que actúa como soporte del contenido del tubo. Colocar el adsorbente especificado en la monografía correspondiente de manera que se forme una columna compacta, homogénea y sin fisuras.

Los adsorbentes más empleados son alúmina, gel de sílice activado y tierra de diatomeas.

Procedimiento - Disolver la muestra en una cantidad apropiada de solvente y agregarla por el extremo superior de la columna. Dejar que esta solución se adsorba y luego agregar nuevas porciones de solvente, de manera que fluya a través de la columna espontáneamente, por aplicación de vacío en la base o ejerciendo presión en el extremo superior. En algunos casos, puede modificarse el procedimiento de carga de la muestra en la columna. Si el producto es sólido (como por ej., comprimidos pulverizados) se lo mezcla íntimamente con una porción del adsorbente empleado para rellenar la columna, sin necesidad de separarlo de su excipiente y se agrega esta mezcla al extremo superior de la columna. El paso posterior de solvente hace progresar la sustancia a través de la columna.

La separación y aislamiento puede mejorarse haciendo circular mayores cantidades de fase móvil o un solvente de mayor poder eluyente, a través de la columna y recolectando distintas fracciones del eluato que contienen los componentes de la muestra.

La eficiencia de la separación suele controlarse realizando un cromatograma en capa delgada de las fracciones individuales.

Cromatografía de partición

Preparación de la columna - Emplear un tubo cromatográfico de aproximadamente 22 mm de diámetro interno y 200 a 300 mm de largo, sin disco de vidrio poroso en su extremo, al que se ajusta un tubo de salida, sin robinete, de aproximadamente 4 mm de diámetro interno y 50 mm de largo, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Adaptar un trozo de lana de vidrio en la base del tubo. Transferir el volumen de fase estacionaria y la cantidad de soporte sólido especificados en la monografía correspondiente a un vaso de precipitados de 100 a 250 ml y mezclar hasta obtener una mezcla homogénea y espesa. Transferir esta mezcla al tubo cromatográfico y apisonar presionando suavemente, hasta obtener una masa uniforme. Si la cantidad de soporte sólido especificada es mayor de 3 g, transferir la mezcla al tubo en porciones de aproximadamente 2 g y apisonar cada porción.

Procedimiento - La muestra se puede agregar a la parte superior de la columna disuelta en un volumen apropiado de fase móvil o empleando una solución de la muestra en un volumen apropiado de fase estacionaria mezclada con una parte adicional del soporte sólido y transferida a la parte superior de la columna como una capa extra de soporte. La muestra puede también ser incorporada en la fase estacionaria, completando la transferencia cuantitativa al tubo cromatográfico, lavando el vaso de precipitados, empleado para la preparación de la muestra, y agregando una mezcla de aproximadamente 1 g de soporte sólido y varias gotas del solvente empleado para preparar la solución muestra. Colocar un trozo de lana de vidrio fina por encima del soporte de la fase estacionaria para completar la columna. Dejar que se adsorba completamente en la fase estacionaria y luego agregar fase móvil en varias porciones, permitiendo que cada una penetre en la columna completamente, antes de comenzar la elución.

Como fase móvil emplear el solvente o la solución especificada en la monografía correspondiente. Equilibrar la fase móvil con agua si la fase estacionaria es una solución acuosa o si la fase estacionaria es un líquido orgánico polar, equilibrar con ese líquido.

Cuando la valoración o el ensayo requieren el empleo de varias columnas cromatográficas colocadas en serie, cuando se especifique el agregado de la fase móvil en porciones o el cambio en la composición de la misma, dejar que cada porción drene completamente a través de la columna y lavar el vástago con fase móvil antes del agregado de cada porción.

CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

El mecanismo predominante en Cromatografía en papel es la partición, esto se debe a que el papel posee un contenido natural de agua que puede ser considerada como fase estacionaria. Sin embargo, en la práctica, las separaciones frecuentemente son el resultado de la combinación de efectos de adsorción y partición.

Cromatografía descendente

Aparato - Consta de:

- Una cámara con cierre hermético para permitir la saturación con los vapores de la fase móvil, generalmente construida de vidrio, acero inoxidable o porcelana y diseñada de manera que permita seguir el proceso sin necesidad de abrirla.
- Un bastidor de material resistente a la corrosión, aproximadamente 5 cm más corto que la altura interior de la cámara. El bastidor sirve de soporte a las cubetas que contienen la fase móvil y de las cuales se suspenden las hojas de papel.
- Una o más cubetas de vidrio o de material inatacable por la fase móvil.
- Varillas de vidrio, colocadas en forma paralela al borde de cada cubeta para mantener suspendidas la hoja de papel.
- Hojas de papel cromatográfico de textura y espesor apropiados.

Procedimiento - Trazar una línea transversal, cerca de uno de los extremos del papel, de modo que cuando se sumerja en la fase móvil quede a unos pocos centímetros por debajo de la varilla de vidrio. Disolver la muestra en un solvente apropiado. Aplicar un volumen de la solución así obtenida que contenga aproximadamente entre 1 y 20 mg de la sustancia a en sayar sobre la línea anteriormente trazada y un volumen similar de la *Sustancia de referencia* dejando no menos de 3 cm entre cada aplicación. Las aplicaciones no deben formar una mancha mayor de 6 a 10 mm de diámetro, para ello aplicar las soluciones en porciones sucesivas dejando secar luego de cada aplicación.

Sujetar el papel por el extremo donde se aplicó la muestra dentro de la cubeta. El papel debe pasar por encima de la varilla colocada en el borde de la cubeta y debe colgar libremente en la cámara, sin tocar su fondo o sus paredes.

Colocar una cantidad apropiada de fase móvil en el fondo de la cámara y cerrarla herméticamente. Dejar la cámara en estas condiciones durante un período que permita que el ambiente se sature y el papel se equilibre con el vapor de la fase móvil. La saturación de la cámara puede favorecerse mediante el revestimiento de las paredes internas con un papel humedecido en fase móvil.

Colocar la fase móvil en la cubeta y cerrar la cámara herméticamente. Dejar descender la fase móvil por el papel, hasta que haya recorrido la distancia deseada. Retirar el papel de la cámara, marcar rápidamente el frente del solvente y dejar secar.

Observar los cromatogramas directamente o revelar la posición de las manchas empleando reactivos apropiados. Comparar los cromatogramas obtenidos a partir de la muestra y la *Sustancia de referencia*.

La sección del papel que contiene la sustancia o sustancias aisladas puede cortarse y eluirse con un solvente apropiado. La solución resultante puede ser valorada mediante técnicas químicas o instrumentales apropiadas empleando *Sustancias de referencia*, tratadas de la misma manera que la muestra, en un intervalo apropiado dé concentraciones para realizar una curva de calibración.

Cromatografía ascendente

Aparato - Emplear el aparato descrito en *Cromatografía descendente*.

Procedimiento - Aplicar la muestra y la *Sustancia de referencia* según se indica para el *Procedimiento* en *Cromatografía descendente*. Transferir una cantidad apropiada de fase móvil para cubrir el fondo de la cámara. Colocar la cubeta vacía en el fondo de la cámara. Colocar el papel empleando un soporte apropiado dentro de la cubeta vacía, procurando que no toque las paredes de la cámara. Cerrarla herméticamente y dejarla en estas condiciones durante un período que permita que el ambiente se sature y el papel se equilibre con el vapor de la fase móvil. Colocar la fase móvil en la cubeta y cerrar la cámara herméticamente. Dejar que el solvente ascienda por el papel hasta que haya recorrido la distancia deseada. Retirar el papel de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar.

[NOTA: pueden emplearse cámaras cilíndricas, de vidrio, que no requieren el empleo de cubetas y en las que la fase móvil se coloca directamente sobre el fondo de la cámara. El papel se suspende de la tapa que cierra la cámara. Durante la etapa de equilibrio, el extremo inferior del papel no debe tocar la fase móvil. La cromatografía comienza haciendo descender la hoja de papel de modo que toque la fase móvil].

CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA

La Cromatografía en capa delgada es comúnmente empleada para la identificación de sustancias. El mecanismo de separación predominante es la adsorción pero dependiendo del adsorbente empleado pueden observarse también fenómenos de partición.

En cromatografía en capa delgada el adsorbente está constituido por una capa uniforme y relativamente delgada de un material finamente pulverizado que se aplica sobre una placa rígida de vidrio, plástico o metal. Esta técnica presenta varias ventajas sobre la cromatografía en papel, se pueden emplear mayores cantidades de muestra; el tiempo requerido es menor por lo tanto los riesgos de alteración de la muestra por oxidación o por acción de los solventes disminuyen y permite el uso de adsorbentes minerales que hacen posible el empleo de reveladores agresivos, como por ej., ácido sulfúrico.

Aparato - Consta de:

- Placas de material inerte: las más empleadas son de vidrio de 20 cm × 20 cm.
- Un bastidor o soporte de material resistente a la corrosión y aproximadamente 5 cm más corto que la altura interna de la cámara destinado a sostener una o más placas que se disponen enfrentadas por su cara no cubierta por el adsorbente.
- Materiales adsorbentes finamente divididos que pueden ser de origen mineral (gel de sílice, alúmina, etc.) u orgánico (celulosa, poliamidas, etc.), normalmente de 5 a 40 µm de diámetro. Pueden aplicarse directamente sobre la placa de vidrio o adherirse a la placa a través de emplasto de París (sulfato de calcio hidratado) en una relación de 5 a 15 % o con pasta de almidón u otros aglutinantes. El primero no produce superficies duras como el almidón, pero no es afectado por reactivos reveladores fuertemente oxidantes. El adsorbente puede contener materiales que ayuden a la visualización de las manchas que absorben la luz ultravioleta.
- Un aparato apropiado para esparcir el adsorbente de modo que al desplazarlo sobre la placa permita aplicar en toda su superficie una capa uniforme con el espesor deseado.
- Una cámara de vidrio cilíndrica o rectangular de aproximadamente 30 cm de altura por 30 cm de ancho y 16 cm de fondo, provista de una tapa del mismo material que permita el cierre hermético para saturarla con los vapores de la fase móvil.
- Fase móvil constituida por mezclas de solventes orgánicos o soluciones acuosas según se indique en la monografía correspondiente.
- Reactivos reveladores específicos indicados en las monografías correspondientes.
- Un pulverizador que permita aplicar el reactivo revelador, resistente al ataque del mismo.

[NOTA: pueden emplearse placas comerciales preparadas o bien prepararlas en el laboratorio].

Preparación de la placa - Limpiar perfectamente las placas por inmersión en mezcla sulfocrómica (ver *1090. Limpieza de materiales de vidrio*) y luego lavarlas con abundante agua hasta que el líquido que escurre no deje en la superficie de las placas manchas visibles. Secarlas perfectamente.

Suspender el adsorbente, con el agregado o no de reactivos, como por ej., soluciones reguladoras, sustancias fluorescentes, etc., en agua o en solventes orgánicos volátiles, agitar durante 30 segundos, hasta formar una suspensión homogénea. Extender la suspensión sobre una o varias placas, manualmente o con ayuda del aplicador, hasta lograr una capa uniforme de 0,25 a 1 mm de espesor. Dejar en reposo durante 5 minutos. Secar a 105 °C durante 30 minutos y dejar enfriar en un desecador. Generalmente 30 g de adsorbente y 60 ml de agua son suficientes para cinco placas de 20 cm × 20 cm. Cuando se emplea emplasto de París como aglutinante completar la aplicación de los adsorbentes dentro de los 2 minutos de haber agregado el agua, ya que posteriormente la mezcla empieza a endurecer.

Cuando las placas estén secas y a temperatura ambiente, verificar la uniformidad de la distribución y la textura de la capa adsorbente; la luz transmitida muestra uniformidad en la distribución y la luz reflejada muestra uniformidad en la textura. Conservar las placas cromatográficas en un desecador. Deben emplearse dentro de los tres días posteriores a su preparación.

Procedimiento - Colocar en la cámara una cantidad suficiente de fase móvil hasta obtener una capa de 1,5 cm. Adherir hojas de papel de filtro embebidas en la fase móvil a las paredes de la cámara, para facilitar la saturación de la misma con el vapor del líquido, a menos que se especifique de otro modo, en la monografía correspondiente.

Cerrar la cámara herméticamente. Trazar una línea a 2,5 cm del borde inferior y lateral de la placa. Aplicar por separado sobre la línea trazada anteriormente y a no menos de 2 cm entre cada aplicación la solución muestra y la solución estándar empleando una micropipeta para obtener una mancha lo más pequeña posible (preferentemente con un diámetro mayor de 5 mm o bien en una banda perpendicular al sentido del desarrollo del cromatograma, de 10 a 20 mm de largo y 2 a 6 mm de ancho). La aplicación puede realizarse en porciones sucesivas que permitan acumular la cantidad de material requerido, dejando secar cada vez, antes de efectuar la siguiente aplicación.

Dejar secar las aplicaciones, ubicar la placa en el soporte y colocarla dentro de la cámara, de modo que la fase móvil llegue al borde inferior de la placa. Cerrar la cámara y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartos de la longitud de la placa, o la distancia indicada en la monografía correspondiente. Los cromatogramas requieren para su desarrollo aproximadamente de 15 minutos a 1 hora. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar.

En el caso de que se especifique una cromatografía en capa delgada bidimensional, la placa cromatográfica se somete a una cromatografía en una dirección, se seca y luego se somete a una segunda cromatografía en ángulo recto respecto de la dirección original, generalmente en otra cámara equilibrada con un sistema de solventes diferente.

Examinar la placa empleando el método especificado en la monografía correspondiente.

La sección de la placa que contiene la sustancia o sustancias aisladas también pueden separarse empleando una espátula, eluirse con un solvente apropiado y cuantificarse empleando espectrofotometría o fluorescencia.

Existen además instrumentos de lectura, los densitómetros, que miden la concentración de la sustancia sobre la placa como reflectancia o transmitancia, por absorción de luz o fluorescencia, empleando longitudes de onda entre 190 y 800 nm seleccionadas con filtros o sistemas de difracción. La señal generada puede ser enviada a un registrador gráfico, integrador o u na computadora provista de programas apropiados.

CROMATOGRAFÍA DE GASES

La Cromatografía de gases se emplea para la separación de sustancias o mezcla de sustancias volátiles. Pueden emplearse los siguientes sistemas:

Cromatografía gas-líquido: la fase estacionaria puede estar contenida en columnas rellenas o capilares. En las columnas rellenas, la fase líquida se deposita sobre un soporte sólido finamente dividido e inerte en una columna de 1 a 3 m de longitud × 2 a 4 mm de diámetro interno. Los soportes más comúnmente empleados son tierra de diatomeas, polímeros porosos o carbono grafito. En las columnas capilares, que no contienen soporte, la fase líquida se deposita en la superficie interna de la columna o puede unirse químicamente a ella.

Cromatografía gas-sólido: se emplea como fase estacionaria alúmina, sílice, carbono o resinas porosas poliaromáticas.

Aparato - Consta de:

- Un reservorio de gas transportador constituido por un gas comprimido, como por ej.: helio, nitrógeno, hidrógeno, argón o mezclas (como por ej., 95 % de argón y 5 % de metano) según el tipo de detector y columna empleados.
- Un sistema de inyección constituido por una jeringa o un inyector automático.

Los inyectores pueden ser:

Inyectores de flujo dividido: son inyectores capaces de dividir la muestra en dos fracciones, una pequeña que se introduce en la columna y una grande que se desecha. También pueden emplearse en modo normal sin desechar ninguna porción de la muestra para el análisis de trazas o componentes minoritarios.

Inyectores de purga y trampa: están equipados con un dispositivo por el cual las sustancias volátiles de la solución se capturan en una trampa de baja temperatura. Una vez que se completa el atrapado de las sustancias, se liberan en el gas transportador mediante la calefacción rápida de la trampa, la cual posee un dispositivo programable de temperatura.

Inyectores de espacio libre superior: poseen un sistema de temperatura programable. Las muestras líquidas o sólidas se colocan en envases perfectamente cerrados y se calientan durante un período de tiempo fijo, lo que permite que los componentes volátiles de la muestra alcancen un equilibrio entre las fases no gaseosa y gaseosa (espacio libre superior del envase). Una vez establecido el equilibrio, el inyector introduce automáticamente una cantidad determinada del espacio libre superior del envase en el cromatógrafo de gases.

- Las columnas pueden ser capilares o rellenas. Las columnas capilares, generalmente fabricadas con sílice fundida, poseen un diámetro interno de 0,20 a 0,53 mm (estas últimas también llamadas macrocapilares) y 5 a 60 m de longitud. El espesor

de la fase estacionaria, que a veces se une químicamente a la superficie interna, es de 0,1 a 1,0 µm, aunque para las fases estacionarias no polares puede ser hasta 5 µm.

Las columnas rellenas, de vidrio o metal, poseen un diámetro interno de 2 a 4 mm y 1 a 3 m de largo. Generalmente contienen un polímero poroso sobre soporte sólido o solo soporte sólido.

El tiempo de retención y la eficiencia dependen de la temperatura, del caudal del gas transportador. El tiempo de retención es también directamente proporcional a la longitud de la columna, mientras que la resolución es proporcional a la raíz cuadrada de la longitud de la columna. Para las columnas rellenas, el caudal del gas transportador se expresa generalmente en ml por minuto a presión atmosférica y temperatura ambiente y se mide a la salida del detector con un caudalímetro mientras la columna está a la temperatura de trabajo. Para un caudal determinado, la velocidad lineal a través de una columna rellena es inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de la columna. Para las columnas capilares habitualmente se emplea velocidad lineal en lugar de caudal.

- Un detector seleccionado de acuerdo a las características de la muestra. El detector debe mantenerse a una temperatura superior a la de la columna para impedir la condensación de las sustancias eluidas. Para los análisis cuantitativos los detectores deben brindar una respuesta que debe ser directamente proporcional a la cantidad de la sustancia presente en el detector para un intervalo amplio de concentraciones. El detector más comúnmente empleado es el de ionización a la llama pero también son empleados el de conductividad térmica, captura electrónica, nitrógeno-fósforo y espectrometría de masa.

Detector de ionización a la llama: poseen un intervalo lineal, amplio y es sensible a la mayoría de los compuestos orgánicos. La respuesta de los detectores depende de la estructura y la concentración del compuesto y del caudal del gas de combustión, del aire, del gas de compensación y del gas transportador. Cuando se emplean columnas rellenas el gas transportador puede ser helio o nitrógeno y cuando se emplean columnas capilares el gas transportador puede ser helio o hidrógeno, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Detector de conductividad térmica: posee un alambre a una temperatura determinada, colocado en la corriente del gas transportador. Mide la diferencia de conductividad térmica entre el gas transportador junto con la muestra y el gas transportador sólo cuando atraviesan el detector.

Este detector responde en forma uniforme a las sustancias volátiles cualquiera sea su estructura, sin embargo, es considerablemente menos sensible que el detector de ionización a la llama.

Detector de ionización a la llama alcalino: a veces llamado NP o detector de nitrógeno-fósforo, contiene una fuente termoiónica, constituida por una sal de un metal alcalino o un elemento de vidrio que contiene rubidio u otro metal, que produce la ionización de compuestos con nitrógeno y fósforo orgánicos. Es un detector selectivo que muestra poca respuesta a los hidrocarburos.

Detector de captura electrónica: contiene una fuente de radiación ionizante. Presenta una respuesta sumamente alta con sustancias que contienen halógenos y grupos nitro pero pequeña con hidrocarburos. La sensibilidad aumenta con el número y peso atómico de los átomos de halógeno.

- Un registrador que recibe la señal del detector y calcula las respuestas de los picos e imprime el cromatograma con los parámetros del cromatograma y los picos. Los datos obtenidos pueden almacenarse y reprocesarse, con cambios en la integración y otras variables de cálculo según sea necesario.

Los datos también pueden recolectarse para ser medidos manualmente en registradores sencillos o en integradores que pueden calcular respuestas de picos o que producen cromatogramas con respuestas y alturas de los picos y permiten el almacenado de datos para un posible reprocesado.

Procedimiento - Acondicionar la columna, el inyector y el detector. Preparar las soluciones estándar y muestra según se especifica en la monografía correspondiente.

Adecuar el sistema cromatográfico según se indica en la monografía correspondiente.

Inyectar por separado las soluciones estándar y muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se especifica en la monografía correspondiente.

Una fuente importante de error es la de irreproducibilidad en la cantidad de muestra inyectada, en particular cuando se hacen inyecciones manuales con una jeringa. Para reducir esta variabilidad, se agrega un estándar interno, compuesto que no interfiere en el cromatograma, en la misma concentración en las soluciones muestra y estándar. El cociente entre la respuesta de la sustancia ensayada y la respuesta del estándar interno se compara de un cromatograma a otro. El estándar interno debe ser sometido a todo el proceso de preparación de la muestra, para controlar además otros aspectos del análisis cuantitativo. Los inyectores automáticos mejoran la reproducibilidad

de las inyecciones y reducen la necesidad del estándar interno.

A partir de los resultados obtenidos calcular el contenido de la o las sustancias a ensayar.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA

La Cromatografía de líquidos de alta eficacia, CLAE, (comúnmente llamada HPLC en inglés), es denominada también Cromatografía líquida de alta resolución o rendimiento. La Cromatografía líquida de alta eficacia tiene la ventaja de que las separaciones pueden tener lugar a temperatura ambiente para muchas sustancias. Por lo tanto, las sustancias no volátiles o térmicamente inestables, pueden cromatografiarse sin descomposición o necesidad de hacer derivados volátiles.

La afinidad de una sustancia por la fase estacionaria y, por consiguiente, su tiempo de retención en la columna, se controla variando la polaridad de la fase móvil mediante el agregado de un segundo y, a veces, un tercer o hasta un cuarto componente.

Aparato - Consta de:

- Un reservorio de fase móvil.
- Un sistema de bombeo que impulsa cantidades exactas de fase móvil desde el *Reservorio de fase móvil* a la columna mediante tuberías y uniones aptas para soportar altas presiones. Los sistemas modernos constan de una o varias bombas dosificadoras, controladas por computadora, que pueden programarse para variar la composición de la fase móvil cuando se trabaja con gradiente o para mezclar los componentes de la fase móvil cuando se trabaja en condiciones isocráticas. Generalmente se trabaja con gradiente cuando la muestra es muy compleja o contiene sustancias que difieren mucho en su factor de capacidad.

Las bombas pueden dar origen a caudales de hasta 10 ml por minuto y generar presiones de hasta 6.000 psi. Sin embargo, los caudales típicos son de 1 a 2 ml por minuto, con presiones no mayores a 2.000 ó 2.500 psi. Las bombas empleadas para el análisis cuantitativo son de material resistente tanto al ataque químico como al ataque mecánico y son capaces de entregar la fase móvil a una velocidad constante, con fluctuaciones mínimas, durante períodos prolongados.

- Un sistema de inyección empleado para introducir la muestra.
- Una columna donde se produce la separación efectiva de los componentes de la muestra inyectada.

Las fases estacionarias para la cromatografía de líquidos en fase reversa constan de una fase orgánica químicamente unida a sílice u otros materiales. Las partículas son generalmente de 3 a 10 µm de diámetro pero los tamaños pueden llegar hasta 50 µm o más para las columnas preparativas. Las partículas recubiertas con una capa delgada de fase orgánica tienen una baja resistencia a la transferencia de masa y, por lo tanto, se obtiene una transferencia rápida de las sustancias entre la fase estacionaria y la fase móvil. La polaridad de la fase estacionaria depende de la polaridad de sus grupos funcionales que van desde el octadecilsilano relativamente no polar a grupos nitrilo muy polares.

Por lo general, las columnas empleadas para las separaciones analíticas tienen diámetros internos de 2 a 5 mm; para la cromatografía preparativa se emplean columnas de diámetro mayor. En algunos casos las columnas pueden calentarse para mejorar la eficiencia durante la separación, pero rara vez se las emplea a temperaturas por encima de los 60 °C, debido a la potencial degradación de la fase estacionaria o a la volatilidad de la fase móvil. Las columnas se emplean a temperatura ambiente, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

- Un detector. Se emplean generalmente:

Detector espectrofotométrico: consta de una celda de flujo colocada a la salida de la columna. Un haz de radiación ultravioleta pasa a través de la celda de flujo en forma perpendicular a la dirección del flujo de la fase móvil e incide en el fotodetector. A medida que las sustancias eluyen de la columna, pasan a través de la celda y absorben la radiación, lo que da lugar a cambios cuantificables en el nivel de energía. Este detector es el más empleado.

Existen detectores de longitud de onda fija, variable y múltiple. Los detectores de longitud de onda fija operan a una sola longitud de onda, en general 254 nm, emitida por una lámpara de mercurio de baja presión. Los detectores de longitud de onda variable contienen una frente continua, como una lámpara de deuterio o de xenón de alta presión y un monocromador o un filtro de interferencia que generan una radiación monocromática a una longitud de onda seleccionada por el analista. Los detectores de longitud de onda variable pueden programarse para variar la longitud de onda durante el análisis. Los detectores de longitud de onda múltiple miden la absorbancia a dos o más longitudes de onda simultáneamente.

Detectores por arreglo de diodos: el haz de luz continua atraviesa la celda. Luego la radiación es resuelta en sus longitudes de onda constitutivas que son detectadas individualmente mediante el arreglo de diodos. Estos detectores adquieren los datos de absorbancia sobre el intervalo total UV-visible y, por lo tanto, proveen al analista varias longitudes de

onda seleccionadas y espectros de los picos eluidos. Los arreglos de diodos tienen, por lo general, menor relación señal-ruido que los detectores de longitud de onda fija o variable y, por lo tanto, son menos apropiados para el análisis de sustancias presentes en bajas concentraciones.

Detectores de índice de refracción: miden la diferencia entre el índice de refracción de la fase móvil sola y el de la fase móvil que contiene las sustancias cromatografiadas según eluyan de la columna. Se emplean para detectar sustancias que no absorben radiación ultravioleta, pero son menos sensibles que los detectores ultravioleta. Son sensibles a pequeños cambios en la composición del solvente, el caudal y la temperatura, por ello se emplea una celda de referencia que contiene la fase móvil para obtener una línea de base satisfactoria.

Detectores fluorométricos: son sensibles a l as sustancias fluorescentes o que puedan convertirse en derivados fluorescentes, ya sea mediante la transformación química de la sustancia o acoplando reactivos fluorescentes en grupos funcionales específicos.

Detectores electroquímicos, potenciométricos, voltamétricos o polarográficos: son útiles para la cuantificación de sustancias que pueden oxidarse o reducirse en un electrodo de trabajo. Estos detectores son selectivos, sensibles y confiables pero las fases móviles deben estar libres de oxígeno disuelto o iones metálicos oxidantes. Debe emplearse una bomba sin pulso y el pH, la fuerza iónica y la temperatura de la fase móvil deben permanecer constantes. Los electrodos de trabajo son propensos a la contaminación por los productos de reacción con las consiguientes variaciones en las respuestas. Los detectores electroquímicos con electrodos de pasta de carbono pueden emplearse ventajosamente para medir cantidades muy pequeñas, del orden de los ng de sustancias fácilmente oxidables en particular fenoles y catecoles.

-Un registrador que recibe la información del detector y realiza la impresión del cromatograrna. Los dispositivos modernos almacenan la señal de salida del detector permitiendo reprocesar el cromatograma luego de cambiar las variables de integración. También pueden emplearse para programar el cromatógrafo controlando la mayoría de las variables y automatizando el proceso.

Procedimiento - La composición de la fase móvil influye significativamente en la resolución de las sustancias en la muestra. [NOTA: deben emplearse solventes de grado HPLC y reactivos de alta pureza].

Equilibrar la columna con la fase móvil y preparar las soluciones estándar y muestra según se especifique en la monografía correspondiente. Las soluciones deben ser filtradas.

Adecuar el sistema cromatográfico según se especifica en la monografía correspondiente.

Inyectar por separado las soluciones estándar y muestra, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se especifique en la monografía correspondiente.

A partir de los valores obtenidos calcular el contenido de la o las sustancias a ensayar.

Los métodos generalmente empleados son los de estándar externo y estándar interno. En general se obtienen resultados confiables por los sistemas de estándar externo, especialmente cuando se emplean inyectores automáticos. Este método compara directamente la respuesta obtenida cromatografiando separadamente soluciones estándar y muestra. En otros casos se obtienen mejores resultados empleando el sistema de estándar interno. En este caso se agrega una cantidad conocida de una sustancia no interferente, el estándar interno, a las soluciones muestra y estándar. Luego se compara la relación de respuesta estándar/estándar interno y muestra/estándar interno.

CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN

En la Cromatografía de exclusión las sustancias presentes en la muestra se separan de acuerdo a su tamaño. Los compuestos cuyas dimensiones sean mayores que el tamaño de poro de la fase estacionaria atraviesan la columna sin ser retenidos y eluyen al volumen de exclusión V_O (volumen muerto). Los compuestos cuyas dimensiones sean menores que el tamaño de poro de la fase estacionaria se introducen en los poros, quedan retenidos por más tiempo y eluyen al volumen total de permeación V_T (cuanto menor sea dicho tamaño más tiempo quedan retenidos en los poros y viceversa).

La Cromatografía de exclusión se puede dividir en Cromatografía de permeación de geles que emplea fases móviles orgánicas no polares y rellenos hidrofílicos y Cromatografía por filtración de geles que emplea fases móviles acuosas y rellenos hidrofóbicos.

Aparato - Emplear el cromatógrafo descrito en *Cromatografía de líquidos de alta eficacia*.

- Columna. [NOTA: si fuera necesario, controlar la temperatura de la columna].

El material de relleno puede ser un soporte blando, como por ej., un gel o un soporte rígido, como por ej., vidrio, sílica o un polímero orgánico entrecruzado compatible con la fase móvil.

- Detector. Generalmente los detectores se basan en propiedades luminiscentes, refractarias o fotométricas (ver *Detectores* en *Cromatografía de líquidos de alta eficacia*). [NOTA: si fuera necesario, se puede conectar a un colector automático de fracciones].

Procedimiento - Rellenar la columna según se especifica en la monografía correspondiente. Las características de elusión de un compuesto en un sistema cromatográfico determinado se puede describir por el coeficiente de distribución, K_D, el cual se calcula por la fórmula siguiente:

$$(V_1 - V_O)/(V_T - V_O)$$

en la cual V_O es el volumen de retención para la sustancia no retenida, V_T es el volumen de retención para la sustancia que tiene acceso total a todos los poros del material de relleno y V_1 es el volumen de retención para la sustancia a ensayar. Medir cada volumen de retención desde el momento de la aplicación hasta el momento de cada pico máximo en particular.

Determinación de la composición relativa de cada componente en la mezcla - Proceder para la separación según se especifica en la monografía correspondiente. Medir las respuestas de los picos principales. Si todos los componentes de la muestra poseen propiedades fisicoquímicas equivalentes, como por ej., la absortividad, calcular la cantidad relativa de cada componente dividiendo la respuesta del pico respectivo por la suma de las respuestas de los picos de todas las sustancias de ensayo. Si los componentes de la muestra no poseen propiedades fisicoquímicas equivalentes calcular el contenido empleando curvas de calibración obtenidas según se especifica en la monografía correspondiente.

Determinación de pesos moleculares - Determinar los pesos moleculares de los componentes de la muestra comparando con los estándar de calibración especificados en las monografías correspondientes. Graficar los volúmenes de retención de los estándar de calibración en función del logaritmo de sus pesos moleculares. Trazar la línea recta que mejor se ajuste a los puntos graficados dentro de los límites de exclusión total y de permeación total. Los pesos moleculares de los componentes de la muestra se estiman a partir de la curva de calibración.

Determinación de la distribución de pesos moleculares en polímeros - Proceder según se especifica en las monografías correspondientes.

INTERPRETACIÓN DE LOS CROMATOGRAMAS

En la *Figura 1* se representa una separación cromatográfica típica de dos sustancias; 1 y 2, donde t_1 y t_2 son los tiempos de retención, respectivamente; h, $h/2$ y $W_{h/2}$ son la altura, la mitad de la altura y el ancho a la mitad de la altura, respectivamente, para el pico 1; W_1 y W_2 son los anchos de los picos 1 y 2 en la línea de base, respectivamente.

La coincidencia de los tiempos de retención de una muestra y una *Sustancia de referencia* en un único sistema cromatográfico puede emplearse como una característica en la construcción de un perfil de identidad, pero es insuficiente para establecer la identidad. Los tiempos de retención absolutos de un compuesto dado varían de un cromatograma al próximo.

[NOTA: en las siguientes fórmulas, tanto los volúmenes de retención como las separaciones lineales son directamente proporcionales al tiempo de retención y pueden sustituirse en las fórmulas]. Normalmente las comparaciones se hacen en función de la retención relativa, a, que se calcula por la fórmula siguiente:

$$\alpha = \frac{(t_2 - t_0)}{(t_1 - t_0)}$$

en la cual t_2 y t_1 son los tiempos de retención de la muestra y del estándar respectivamente, medidos desde el punto de inyección, en condiciones experimentales idénticas en la misma columna y t_O es el tiempo de retención de una sustancia no retenida, como por ej., metano en el caso de la cromatografía de gases.

El número de platos teóricos N, es una medida de la eficiencia de la columna. Para los picos gaussianos, se calcula por la fórmula siguiente:

$$N = 16\left(\frac{t}{W}\right)^2$$

$$N = 5{,}54\left(\frac{t'}{W_{1/2}}\right)^2$$

en la cual t es el tiempo de retención de la sustancia, W es el ancho del pico en su base, obtenido al extrapolar los lados del pico con la línea de base y t' es la diferencia entre el tiempo de retención de la sustancia y el tiempo de elusión de una sustancia que no es retenida (tiempo muerto). El ancho máximo a media altura, $W_{1/2}$, es obtenido directamente por integradores electrónicos.

El valor de *N* depende de la sustancia cromatografiada, así como de las condiciones operativas, como por ej., la fase móvil, el caudal del gas transportador, la temperatura, la calidad y uniformidad de la fase estacionaria y, para las columnas capilares, el espesor de la película de fase estacionaria, el diámetro y la longitud de la columna.

Para la separación de dos sustancias en una mezcla, la resolución, *R*, es determinada por la fórmula siguiente:

$$R = \frac{t_2 - t_1}{1/2(W_2 + W_1)}$$

en la cual t_2 y t_1 son los tiempos de retención de los dos componentes y W_2 y W_1 son los anchos de la base de los picos correspondientes, obtenidos al extrapolar los lados con la línea de base.

La respuesta y la altura del pico son generalmente proporcionales a l a cantidad de sustancia eluida. En general se miden las respuestas de los picos, sin embargo, la medición de las alturas pueden ser más exactas que la respuesta cuando se consideran picos parcialmente superpuestos.

El ensayo de pureza cromatográfica de una materia prima se basa en la determinación de picos de impurezas y se expresa como un porcentaje de la respuesta del pico de la sustancia. Es preferible, sin embargo, comparar los picos de impurezas con el cromatograma de un estándar a u na concentración similar. El estándar puede ser la misma sustancia a un nivel que corresponde, como por ej., 0,5% de impureza, o en el caso de las impurezas tóxicas o de impurezas indicadoras, un estándar de la impureza misma.

El factor de capacidad *k'*, está relacionado con el coeficiente de distribución de la sustancia a ensayar entre ambas fases. El factor de capacidad depende de la naturaleza química de la sustancia; del área, naturaleza y cantidad de fase estacionaria; de la temperatura de la columna y del caudal de la fase móvil. Cada sustancia tiene un factor de capacidad característico para un conjunto específico de condiciones experimentales. La separación cromatográfica sólo se produce si las sustancias involucradas poseen diferentes factores de capacidad. El factor de capacidad se calcula por la fórmula siguiente:

$$k' = \frac{(t_n - t_0)}{t_0}$$

en la cual t_n es el tiempo requerido para que la sustancia a e nsayar eluya a través de la columna (tiempo de retención) y t_o es el tiempo de elusión de una sustancia que no es retenida (tiempo muerto).

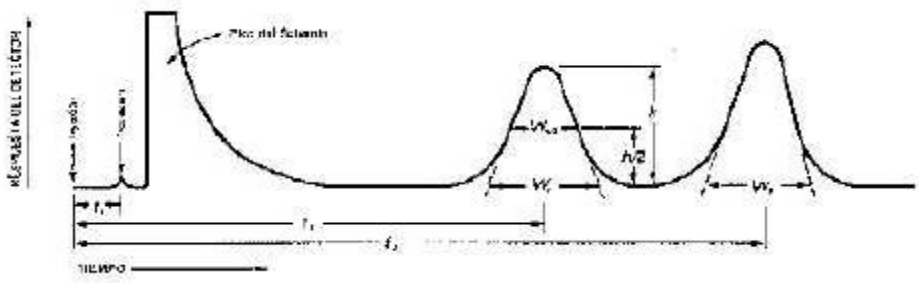


Figura 1. Separación cromatográfica de dos sustancias.

APTITUD DEL SISTEMA

Los ensayos de aptitud del sistema forman parte de los métodos cromatográficos líquido y de gases. Se emplean para comprobar que la resolución y la reproducibilidad del sistema cromatográfico son aptas para realizar el ensayo. Para estos ensayos se considera que el equipo, las operaciones analíticas y las muestras a ensayar constituyen un sistema único que puede evaluarse corno tal.

Los parámetros de aptitud del sistema se determinan para el pico de la sustancia, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Si es necesario, pueden realizarse ajustes en las condiciones operativas para cumplir con los requisitos de aptitud del sistema, entre ellos, las proporciones de los componentes de la fase móvil y el caudal.

La resolución *R*, es una función de la eficiencia de la columna *N*, y se especifica para asegurar que las sustancias que eluyan muy cercanas se resuelvan entre sí y para asegurar que los estándares internos se resuelvan de las sustancias a en sayar. La eficiencia de la columna puede especificarse también como un requisito de aptitud del sistema, especialmente si hay un solo pico de interés en el cromatograma, sin embargo, el valor aislado de eficiencia no puede asegurar la resolución para el sistema en estudio. La eficiencia de la columna es una medida de la agudeza de los picos, importante para detectar componentes en baja concentración.

Para evaluar si se cumplen los requisitos de aptitud del sistema se realizan inyecciones repetidas de la *Preparación estándar* empleada en la *Valoración* u otra *Solución estándar*. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para calcular la desviación estándar relativa, S_R, se emplean los datos de cinco inyecciones repetidas del estándar si el requisito es 2,0 % o menor, y seis inyecciones repetidas si el requisito de la desviación estándar relativa es mayor de 2,0 %. La desviación estándar relativa S_R, se calcula según la fórmula siguiente:

$$S_R = \frac{100}{\overline{X}} \sqrt{\frac{\sum \left(x_i - \overline{X}\right)^2}{n-1}}$$

El factor de asimetría *F*, una medida de la simetría del pico, es 1 para los picos perfectamente simétricos y su valor aumenta a medida que la asimetría es más pronunciada (ver *Figura 2*). En algunos casos, pueden observarse valores menores de la unidad. Como consecuencia de la asimetría del pico, la integración y la precisión se tornan menos confiables.

EI factor de asimetría se calcula por la fórmula siguiente:

$$F = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

en la cual $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5 % de altura y *f* es la distancia entre el borde simétrico del pico y el centro del mismo medida al 5 % de la altura.

Estos datos se obtienen a partir de inyecciones repetidas del estándar u otras soluciones según se especifique en la monografía correspondiente.

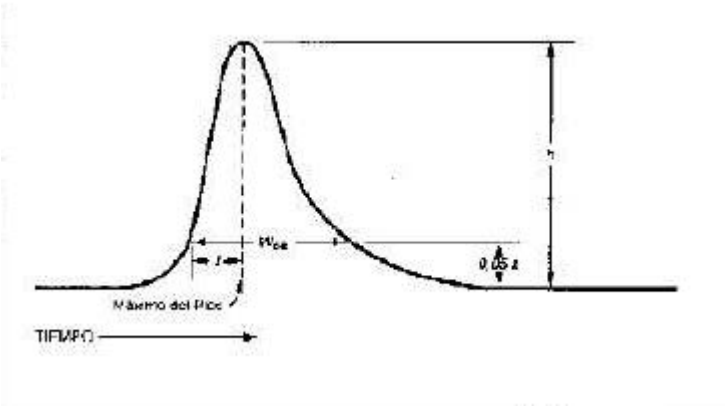


Figura 2. Pico cromatográfico asimétrico

110. DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS

Precauciones - *Las aflatoxinas son sustancias carcinogénicas. Se debe trabajar bajo campana, evitar la inhalación, el contacto con la piel y en lo posible no abrir los envases originales hasta que se realice la disolución*.

[NOTA: para descontaminar el material empleado, sumergirlo en solución de hipoclorito de sodio al 2 %, dejar actuar durante 18 horas como mínimo, agregar acetona al 5 %, dejar actuar durante 30 minutos y lavar con agua].

Método I
Determinación de aflatoxinas por cromatografía en capa delgada

Este método se emplea para detectar aflatoxinas en drogas vegetales destinadas a la elaboración de infusiones, cocimientos y todos aquellos productos que sufren un tratamiento térmico antes de la administración.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Cloroformo y acetona (9:1).

Solución reguladora de fosfato pH 7,4 - Transferir 1,0 g de cloruro de potasio, 1,0 g de fosfato monobásico de potasio, 5,8 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y 40,0 g de cloruro de sodio a un matraz aforado de 5 litros. Agregar aproximadamente 4,5 litros de agua y disolver. Ajustar a pH 7,4 empleando ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, según sea necesario. Diluir a volumen con agua y ajustar nuevamente el pH.

Soluciones madre del estándar - Disolver el contenido del envase de cada aflatoxina en una mezcla de benceno y acetonitrilo (98:2). Diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente hasta obtener soluciones con una concentración de 8 a 10 µg por ml de cada aflatoxina. Agitar vigorosamente la solución durante 1 minuto. Determinar la absorbancia de cada solución a 350 nm, con un espectrofotómetro apropiado, empleando una mezcla de benceno y acetonitrilo (98:2) como blanco. Calcular la concentración de la respectiva aflatoxina, en mg por ml, por la fórmula siguiente:

$$1.000\,AP/\varepsilon$$

en la cual P es el peso molecular asignado de la aflatoxina correspondiente y ε es la absortividad molar para cada aflatoxina en la mezcla de benceno y acetonitrilo (98:2). Los valores de P y ε se encuentran en la *Tabla 1*.

[NOTA: almacenar las aflatoxinas en el envase original a – 20 °C. Las *Soluciones madre del estándar* de cada aflatoxina deben llevarse a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente o en estufa de vacío a 60 °C. Preservar las toxinas así obtenidas en un envase con cierre hermético-protegido de la luz a – 20 °C. Estas soluciones son estables por 1 año o más].

Tabla 1.

Aflatoxina	P	ε
B_1	312	19.800
B_2	314	20.900
G_1	328	17.100
G_2	330	18.200

Solución estándar – Transferir alícuotas de cada una de las *Soluciones madre del estándar* valoradas, a un envase de 3 ml de vidrio inactínico, agregar cantidad suficiente de una mezcla de benceno y acetonitrilo (98:2) para preparar una solución que contenga 1 µg por ml de B_1, 0,5 µg por ml de B_2, 1 µg por ml de G_1 y 0,5 µg por ml de G_2.

Columna cromatográfica - Emplear una columna cromatográfica de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales específicos para aflatoxinas.

Solvente de extracción - Disolver 5 g de cloruro de sodio en 200 ml de una mezcla de metanol y agua (70:30).

Solución muestra - Transferir 25 g de la muestra, previamente molida y tamizada con tamiz N° 20, exactamente pesados, a un erlenmeyer de 500 ml. Agregar cantidad suficiente de *Solvente de extracción* para que toda la muestra quede embebida. Agitar 1 hora en un agitador mecánico o 5 minutos en licuadora a alta velocidad. Filtrar y recolectar el filtrado en un erlenmeyer de 250 ml. Transferir 80 ml del extracto, exactamente medidos, a un erlenmeyer de 250 ml, agregar 160 ml de *Solución reguladora de fosfato pH 7,4*. Agitar y filtrar a través de una membrana filtrante de porosidad entre 0,8 y 1,6 µm. Aplicar 120 ml del filtrado (equivalente a 5 g de muestra) a través de la *Columna cromatográfrca*, asegurando un caudal de 1 ó 2 gotas por segundo y cuidando que la columna no se seque. Lavar la columna con 20 ml de *Solución reguladora de fosfato pH 7,4* y secar haciendo pasar aire a través de la misma con una jeringa vacía. Descartar el líquido de lavado. Eluir las aflatoxinas adsorbidas en la columna

lentamente por acción de la gravedad con 2 ml de metanol. Recolectar todo el eluido en un balón de 25 ml con un pequeño reservorio en el fondo. Llevar a sequedad en un evaporador rotatorio a 60 °C. Disolver el residuo en 100 µl de una mezcla de benceno y acetonitrilo (98:2).

Solución del estándar interno - Mezclar 10 µl de la muestra con 4 µl de la *Solución estándar*.

Revelador - Solución de ácido sulfúrico al 30 % v/v.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de la *Solución muestra*, 2; 4; y 6 µl de la *Solución estándar* y 10 µl de la *Solución del estándar interno*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 11 cm. Retirar la placa de la cámara y marcar el frente del solvente. Secar la placa al aire protegida de la luz. Examinar la placa bajo luz ultravioleta a 360 nm: las aflatoxinas B_1 y B_2 aparecen como manchas azules y las G_1 y G_2 como manchas verdes. Los valores de R_f son aproximadamente: 0,4 para G_2, 0,5 para G_1, 0,6 para B_2 y 0,7 para B_1. Para confirmar pulverizar sobre la placa con *Revelador*. Dejar secar a la oscuridad y observar bajo luz ultravioleta a 360 nm: las cuatro aflatoxinas se observan como manchas amarillas. Calcular la concentración de cada aflatoxina, en µg por kg, en la porción de muestra tomada, por la fórmula siguiente:

$$(PCV)/Sm$$

en la cual P es el volumen, en µl, de *Solución estándar sembrado*, C es la concentración de aflatoxina en la *Solución estándar* (B_1 y G_1 1 µg por ml y B_2 y G_2 0,5 µg por ml), V es el volumen, en µl, de la dilución final del residuo, S es el volumen de *Solución muestra sembrado* y m es el peso del residuo en g.

Método II
Determinación de aflatoxinas por cromatografía líquida

Este método se emplea para determinar aflatoxinas en formas farmacéuticas de uso oral y tópica sin tratamiento térmico antes de la administración.

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos equipado con un detector de fluorescencia capaz de proveer una excitación de 360 nm y una emisión de 440 nm y una columna 15 cm x 4 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5 µm de diámetro. Mantener la columna a aproximadamente 30 °C. El caudal es de aproximadamente 1,0 ml por minuto.

Fase móvil - Agua, acetonitrilo y metanol (40:10:10) filtrado y desgasificado. Hacer los ajustes necesarios (ver *Aptitud del sistema en 100. Cromatografía*).

Solución madre del estándar - Proceder según se indica en *Método I*.

Solución estándar - Transferir alícuotas de cada una de las *Soluciones madre del estándar* valoradas a matraces apropiados y preparar una solución concentrada que contenga 300 ng por ml de B_1, 50 ng por ml de B_2, 150 ng por ml de G_1 y 50 ng por ml de G_2 empleando una mezcla de benceno y acetonitrilo (98:2). Evaporar a sequedad en estufa de vacío a 60 °C y diluir el residuo con 1 ml de acetonitrilo. Transferir las alícuotas indicadas en la *Tabla 2* de esta solución a matraces aforados de 10 ml, llevar a volumen con acetonitrilo para obtener las soluciones indicadas en la *Tabla 2*.

Tabla 2.

Soluciones estándar diluidas	Alícuota (µl)	Concentración de aflatoxinas (µg por ml)			
		B_1	B_2	G_1	G_2
A	270	81	13,5	40,5	13,5
B	180	4,5	9	27	9,
C	90	27	4,5	13,5	

[NOTA: a partir de la *Tabla 2* preparar al menos cinco *Soluciones estándar diluidas* incluyendo una solución cuya concentración represente el límite de detección del sistema cromatográfico empleado].

Columna cromatográfica - Proceder según se especifica en *Método I*.

Solvente de extracción - Proceder según se especifica en *Método I*.

Solución de derivatización - Mezclar 10 ml de ácido trifluoroacético con 5 ml de ácido acético glacial y 35 ml de agua bidestilada (este volumen es suficiente para realizar 70 derivatizaciones).

Solución muestra - Transferir 25 g de muestra previamente homogeneizada y molida (tamiz N° 20), exactamente pesados, a un erlenmeyer de 500 ml. Agregar cantidad suficiente de *Solvente de extracción* para que toda la muestra quede embebida. Agitar 1 hora en un agitador mecánico o 5 minutos en licuadora a alta velocidad. Filtrar y recolectar el filtrado en un erlenmeyer de 250 ml. Transferir 16 ml del extracto a un erlenmeyer de 125 ml, agregar 32 ml de *Solución reguladora de fosfato pH 7,4*. Agitar y filtrar a través de una membrana filtrante de porosidad de 0,8 a 1,6 µm. Aplicar 24 ml del filtrado a través de la *Columna cromatográfica* asegurando un caudal de 1 ó 2 gotas por segundo y cuidando que la columna no se seque. Lavar la columna con 20 ml de agua y secar haciendo pasar aire a través de la misma con una jeringa vacía. Descartar el líquido de lavado. Eluir las aflatoxinas adsorbidas en la columna lentamente por acción de la gravedad con 2 ml de metanol. Recolectar todo el eluido en un envase de 5 ml de vidrio inactínico. Llevar a sequedad en estufa de vacío a 55 °C. Disolver el extracto con 200 µl de acetonitrilo, agitar vigorosamente y agregar 700 µl de *Solución de derivatización*. Cerrar el envase y mezclar. Calentar a 65 °C durante no menos de 8,5 minutos [NOTA: este tiempo es necesario para una completa derivatización de aflatoxina B_1 (B_2a) y G_1 (G_2a)]. Dejar enfriar a temperatura ambiente antes de abrir el envase.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo 50 µl de cada *Solución estándar diluida*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Graficar las respuestas de los picos en función de la concentración de aflatoxinas, en µg por ml, para cada aflatoxina. Trazar la recta que mejor se ajuste a los puntos marcados. Inyectar en el cromatógrafo 50 µl de la *Solución muestra*, registrar el cromatograma y medir la respuesta de los picos. B_2a, G_2 y B_2 son aproximadamente 6, 8 ,9 y 11 minutos, respectivamente. Calcular la concentración de las aflatoxinas presentes en la *Solución muestra* empleando el gráfico de respuesta en función de la concentración, obtenido a partir de las *Soluciones estándar diluidas*.

120. DETERMINACIÓN DE AGUA

A continuación se describen los métodos empleados en esta Farmacopea para la determinación de agua. Estos métodos se basan en la reacción de Karl Fischer y en la destilación azeotrópica con tolueno.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente emplear el método de titulación volumétrica directa por el método de Karl Fischer.

DETERMINACIÓN DE AGUA POR EL MÉTODO DE KARL FISCHER

La determinación de agua por el método de Karl Fischer se basa en la reacción cuantitativa entre el agua y un reactivo constituido por dióxido de azufre y iodo en presencia de metanol y una base orgánica como la piridina, según la siguiente ecuación:

$$I_2 + S0_2 + 3C_5H_5N + CH_30H + H_20 \rightarrow 2\,(C_5H_5N^+H)I^- + (C_5H_5N^+H)^-OSO_2OCH_3$$

Existen dos métodos diferentes basados en la reacción con el iodo: uno es la titulación volumétrica y el otro es un método de titulación culombimétrica. En el primero, el iodo se disuelve en el reactivo y el contenido de agua es determinado midiendo la cantidad de iodo consumido como resultado de la reacción con el agua. En el otro, el iodo es producido por la electrólisis de un reactivo de Karl Fischer que contiene al ión ioduro. El contenido de agua en una muestra puede ser determinado midiendo la cantidad de electricidad que se requiere para la producción de iodo durante la titulación.

$$2I^- \rightarrow I_2 + 2e^-$$

Titulación volumétrica directa

Aparato - Consta de buretas automáticas, un frasco de titulación, un agitador y un equipo para titulaciones amperométricas a voltaje constante o titulaciones potenciométricas a corriente constante.

Dado que el reactivo de Karl Fischer es sumamente higroscópico, el aparato debe diseñarse de manera que no absorba humedad del ambiente. Para proteger el reactivo de la humedad se emplean además desecantes, como por ej., cloruro de calcio anhidro o gel de sílice.

Reactivo - El reactivo de Karl Fischer puede prepararse por cualquiera de los métodos indicados a co ntinuación. También pueden emplearse reactivos comerciales. [NOTA: el cloroformo y el metanol empleados para la preparación del reactivo deben tener un contenido de agua inferior a 0 ,1 mg por ml. El metilcellosolve y el éter monometílico dietilenglicol deben tener un contenido de agua inferior a 0,3 mg por ml].

Método a - Disolver 63 g de iodo en 100 ml de piridina, con un contenido de agua inferior a 1 mg por ml, enfriar la solución en baño de hielo y hacer pasar dióxido de azufre seco a través de esta solución hasta que el aumento de peso sea de 32 g. Llevar a 5 00 ml agregando cloroformo o metanol y dejar en reposo durante no menos de 24 horas antes de usar.

Método b - Disolver 102 g de imidazol, con un contenido de agua inferior a 0,1 %, en 350 ml de metilcellosolve o éter monometílico dietilenglicol, enfriar la solución en baño de hielo y hacer pasar dióxido de azufre seco a través de esta solución hasta que el aumento de peso sea de 64 g, manteniendo la temperatura entre 25 y 30 °C. Disolver 50 g de iodo en esta solución y dejar en reposo durante no menos de 24 horas antes de usar.

Método c - Hacer pasar dióxido de azufre a través de 150 ml de metilcellosolve hasta que el aumento de peso sea de 32 g. A esta solución, previamente enfriada en un baño de hielo, agregar 250 ml de metilocellosolve o c loroformo que contiene 81 g de 2-metilaminopiridina, con un contenido de agua inferior a 1 mg por ml. Disolver 36 g de iodo en esta solución y dejar en reposo durante no menos de 24 horas antes de usar.

El reactivo de Karl Fischer, preparado por cualquiera de estos métodos, debe estandarizarse antes de cada uso, porque su actividad para la determinación de agua cambia con el tiempo. Almacenar el reactivo en un sitio frío, protegido de la luz y la humedad.

Estandarización del reactivo - Transferir una cantidad apropiada de metanol al frasco de

titulación seco y titular el solvente con reactivo de Karl Fischer hasta alcanzar el punto final. Luego agregar rápidamente 30 mg de agua, exactamente pesados, a la solución en el frasco y titular el agua con el reactivo de Karl Fischer, con agitación enérgica, hasta alcanzar el punto final. Calcular el factor de equivalencia, *f*, correspondiente a la cantidad de agua, en mg, por ml de reactivo, por la fórmula siguiente:

$$f = P/V$$

en la cual *P* es la cantidad de agua tomada, en mg, y *V* es el volumen de reactivo de Karl Fischer, en ml, consumido para la titulación del agua.

Para la determinación de cantidades de agua menores a 1 %, el reactivo puede estandarizarse con tartrato de sodio según se indica a continuación. Transferir una cantidad apropiada de metanol al frasco de titulación seco y titular el solvente con reactivo de Karl Fischer hasta alcanzar el punto final. Agregar rápidamente 150 a 350 mg de tartrato de sodio ($C_4H_4Na_2O_6.2H_2O$) exactamente pesados, y titular hasta alcanzar el punto final. Calcular el factor de equivalencia, *f*, correspondiente a la cantidad de agua, en mg, por ml de reactivo, por la fórmula siguiente:

$$f = 2(18{,}02/230{,}08)(P/V)$$

en la cual 18,02 y 230,08 son los pesos moleculares del agua y del tartrato de sodio dihidratado, respectivamente, *P* es el peso, en mg, de tartrato de sodio dihidratado y *V* es el volumen, en ml, de reactivo consumido para la titulación del agua.

Procedimiento - En general, la titulación de agua con reactivo de Karl Fischer debería llevarse a cabo a la misma temperatura que se hizo la estandarización y evitando la humedad atmosférica. El aparato se equipa con un resistor variable en el circuito y este resistor se manipula para mantener un voltaje constante entre los dos electrodos de platino sumergidos en la solución a ser titulada, midiéndose la variación de intensidad de corriente (titulación amperométrica a voltaje constante). Durante la titulación, la intensidad de corriente en el circuito varía notablemente, pero vuelve al valor original en pocos segundos. Al final de la titulación, la corriente permanece fija en un valor durante un tiempo generalmente mayor a 30 segundos. Este estado se designa como el punto final de la titulación. Adicionalmente, el reactivo de Karl Fischer proporciona un indicador visual del punto final, dado el color característico que produce el exceso de iodo en la solución que se está titulando.

De otra manera, la manipulación del resistor sirve para pasar una corriente definida entre los dos electrodos de platino, midiéndose la variación de potencial (titulaciones potenciométricas a intensidad constante). Con el progreso de la titulación, el valor indicado por el potenciómetro disminuye repentinamente desde un estado de polarización de varios centenares de mV al estado de no polarización, pero vuelve al valor original en pocos segundos. Al final de la titulación, el estado de no polarización persiste por un tiempo generalmente mayor de 30 segundos. Este estado se designa como el punto final de la titulación.

Transferir una cantidad apropiada de metanol al frasco de titulación seco y titular el solvente con reactivo de Karl Fischer hasta el punto final. Tomar una cantidad de muestra, exactamente pesada, que contenga entre 5 y 30 mg de agua, transferirla rápidamente al frasco de titulación, disolver agitando y titular la solución, con agitación enérgica, hasta alcanzar el punto final.

Si la muestra es insoluble, reducir a polvo fino rápidamente, pesar exactamente una cantidad apropiada de la muestra con un contenido de agua estimado entre 5 y 30 mg y transferirla rápidamente al frasco de titulación. Agitar la mezcla entre 5 y 30 minutos, protegiendo de la humedad, y titular con agitación enérgica.

Aunque el procedimiento de titulación debería llevarse a cabo bajo condiciones de baja humedad, si el efecto de la humedad atmosférica no puede evitarse, como por ej., si se requiere un tiempo largo de extracción y titulación, debe realizarse una titulación con un blanco, bajo las mismas condiciones empleadas para la muestra, y hacer las correcciones necesarias.

Calcular el porcentaje de agua presente en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$(Vf/P)100$$

en la cual *V* es el volumen de reactivo de Karl Fischer, en ml, consumido para la titulación, *f* es el factor del reactivo de Karl Fischer, en mg de agua por ml de reactivo, y *P* es la cantidad de muestra, en mg, pesada para la determinación.

Titulación volumétrica por retorno

En la titulación por retorno, se agrega a la muestra un exceso de reactivo, se espera un tiempo suficiente para que la reacción se complete y se titula el exceso de reactivo con una solución estándar de agua en metanol. El procedimiento de titulación por retorno, es generalmente útil y evita las dificultades que pueden encontrarse en la titulación directa de sustancias de las cuales el agua ligada se libera lentamente.

Aparato y reactivo - Ver *Titulación volumétrica directa*.

Solución estándar de agua-metanol - Transferir 500 ml de metanol a un matraz aforado de 1 litro, agregar 2,0 ml de agua y completar a volumen con metanol. Almacenar esta solución en un sitio fresco, protegido de la luz y la humedad.

Estandarizar la *Solución estándar de agua-metanol* según se indica a continuación. Transferir una cantidad apropiada de metanol a un frasco de titulación seco y titular el solvente con reactivo de Karl Fischer hasta alcanzar el punto final. Agregar 10 ml de reactivo de Karl Fischer, exactamente medidos, y titular con *Solución estándar de agua-metanol* hasta el punto final. Calcular la concentración de agua en la solución estándar. *f'*, en mg por ml, por la fórmula siguiente:

$$f' = f\,10/V'$$

en la cual *f* es el factor del reactivo de Karl Fischer empleado en la titulación y *V'* es el volumen, en ml, de *Solución estándar de agua-metanol* consumido en la titulación.

Procedimiento - Cuando se emplea el método amperométrico a voltaje constante, en la titulación por retorno, la aguja del microamperímetro está fuera de escala durante la presencia de exceso de reactivo y vuelve rápidamente a la posición original cuando el sistema alcanza el punto final.

Cuando se emplea el método potenciométrico a intensidad de corriente constante, en la titulación por retorno, la aguja del milivoltímetro está en la posición original durante la presencia de exceso de reactivo. Finalmente aparece un voltaje definido cuando la titulación alcanza el punto final.

Transferir una cantidad apropiada de metanol al frasco de titulación seco y titular el solvente con reactivo de Karl Fischer hasta alcanzar el punto final. Pesar exactamente una cantidad de muestra con un contenido de agua estimado entre 5 y 30 mg, transferirla rápidamente al frasco de titulación y disolver con agitación. Agregar un exceso, exactamente medido, de reactivo de Karl Fischer y titular la solución con la *Solución estándar de agua-metanol*, con agitación enérgica, hasta el punto final.

En el caso de una muestra insoluble, reducir a polvo fino rápidamente, pesar exactamente una cantidad apropiada, transferir rápidamente al frasco de titulación y agregar un exceso, exactamente medido, de reactivo de Karl Fischer. Después de agitar entre 5 y 30 minutos, evitando la humedad atmosférica titular con agitación enérgica. Calcular el porcentaje de agua en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$\left[(Vf - V'f')/P\right]100$$

en la cual *V* es el volumen de reactivo agregado, en ml, *f* es el factor del reactivo en mg de agua por ml de reactivo, *V'* es el volumen, en ml, de la *Solución estándar de agua-metanol* consumido para la titulación, *f'* es el factor de la *Solución estándar de agua-metanol* y *P* es el peso, en mg, de muestra.

Titulación Culombimétrica

Aparato - Consta de un frasco de titulación equipado con una celda electrolítica para la producción de iodo, un agitador y un sistema para la titulación potenciométrica a intensidad de corriente constante. El sistema de producción de iodo se compone de un ánodo y un cátodo, separados por un diafragma. El ánodo se sumerge en la solución del anolito para la determinación de agua y el cátodo se sumerge en la solución del catolito para la determinación de agua. Ambos electrodos son generalmente de platino.

Dado que ambas soluciones, el catolito y el anolito, son fuertemente higroscópicas, el sistema de titulación debe protegerse de la humedad atmosférica. Para este fin, puede emplearse cloruro de calcio anhidro o gel de sílice.

Reactivos - Las soluciones electrolíticas pueden prepararse por alguno de los métodos indicados a continuación, también pueden emplearse reactivos comerciales. [NOTA: el cloroformo y el metanol empleados para la preparación del reactivo deben tener un contenido de agua inferior a 0 ,1 mg por ml. El metilcellosolve y el dietilenglicol monometiléter deben tener un contenido de agua inferior a 0,3 mg por ml].

Método a -

SOLUCIÓN DEL ANOLITO: Disolver 102 g de imidazol en 900 ml de metanol, enfriar la solución en un baño de hielo y hacer pasar dióxido de azufre seco a través de la solución, mantenida a una temperatura inferior a 3 0 °C, hasta que el aumento de peso sea de 64 g. Disolver con agitación 12 g de iodo, agregar una cantidad apropiada de agua a la solución hasta que el color del líquido vire de marrón a amarillo y diluir a 1 litro con metanol.

SOLUCIÓN DEL CATOLITO: Disolver 24 g de clorhidrato de dietanolamina en 100 ml de metanol.

Método b -

SOLUCIÓN DEL ANOLITO: Disolver 40 g de 1,3-di(4-piridil)propano y 30 g de dietanolamina en aproximadamente 200 ml de metanol y hacer pasar dióxido de azufre seco a través de la solución hasta que el aumento de peso sea de 25 g. Agregar 50 ml de carbonato de propileno y disolver 6 g de iodo en la solución. Agregar metanol para completar a 5 00 ml y agregar una cantidad apropiada de agua hasta que el color del líquido vire de marrón a amarillo.

SOLUCIÓN DEL CATOLITO: Disolver 30 g de clorhidrato de colina en metanol y diluir a 100 ml con el mismo solvente.

Método c -

SOLUCION DEL ANOLITO: Disolver 100 g de dietanolamina en 900 ml de metanol o en una mezcla de metanol y cloroformo (3:1) y hacer pasar dióxido de azufre seco a través de la solución hasta que el aumento de peso de la solución sea de 64 g. Disolver 20 g de iodo en la solución y agregar una cantidad apropiada de agua hasta que el color del líquido vire de marrón a amarillo.

SOLUCIÓN DEL CATOLITO: Disolver 25 g de cloruro de litio en 1 litro de una mezcla de metanol y nitrometano (4:1).

Procedimiento - Transferir un volumen apropiado de *Solución del anolito* al frasco de titulación, sumergir en esta solución un par de electrodos de platino para titulación potenciométrica a intensidad de corriente constante. Luego sumergir el sistema de producción de iodo lleno de *Solución del catolito* en la *Solución del anolito*. Iniciar el sistema electrolítico y anhidrizar el contenido del frasco de titulación. Transferir una cantidad, exactamente pesada de muestra, cuyo contenido de agua estimado sea de 0,2 a 5 mg, agregarla rápidamente al frasco de titulación, disolver agitando y titular, con agitación enérgica; hasta el punto final.

Cuando la muestra no pueda disolverse en la solución del anolito, reducir a polvo fino rápidamente y transferir al frasco de titulación una cantidad, exactamente pesada, cuyo contenido de agua estimado sea de 0,2 a 5 mg. Luego de agitar la mezcla durante 5 a 30 minutos, protegida de la humedad atmosférica, titular con agitación enérgica. Determinar la cantidad de electricidad (C) [= intensidad de corriente (A) x tiempo (s)] requerida para la producción de iodo durante la titulación y calcular el contenido de agua (%) en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$[C/10{,}72P]100$$

en la cual C es la cantidad de electricidad requerida para la producción de iodo, 10,72 es la cantidad de electricidad que corresponde a 1 mg de agua y *P* es el peso de muestra, en mg.

Aunque el procedimiento de titulación debería llevarse a cabo bajo condiciones de baja humedad, si el efecto de la humedad atmosférica no puede evitarse, como por ej., si se requiere un tiempo largo para la extracción y la titulación del agua, realizar un ensayo con un blanco, bajo las mismas condiciones que la muestra, y hacer las correcciones necesarias.

DETERMINACIÓN DE AGUA POR DESTILACIÓN AZEOTRÓPICA

Este método se basa en la destilación por arrastre con vapor de tolueno, del agua contenida en la muestra de un producto dado bajo condiciones establecidas.

Aparato (ver *Figura*) - Consiste de un balón *A* de 500 ml, conectado por un tubo *D* al tubo cilíndrico *B* adosado a un tubo receptor graduado *E* y a un refrigerante *C* por medio de juntas esmeriladas. El tubo receptor *E* se gradúa en 0,1 ml. La fuente de calor es preferentemente un calentador eléctrico con un reostato para controlar la temperatura o un baño de vaselina.

La porción superior del balón y el tubo conector deben aislarse.

Procedimiento - Lavar el tubo receptor y el refrigerante con agua y secar. Transferir 200 ml de tolueno y aproximadamente 2,0 ml de agua al balón seco. Destilar durante 2 horas, dejar enfriar durante 30 minutos y leer el volumen de agua. Transferir al balón una cantidad de la muestra, exactamente pesada, cuyo contenido de agua estimado sea de 2 a 3 ml. Si la sustancia tiene una consistencia pastosa, pesarla sobre una pequeña hoja de aluminio. Agregar unos trozos de material poroso y calentar el balón suavemente durante 15 minutos. Cuando el tolueno comienza a hervir, destilar a razón de 2 gotas por segundo hasta que la mayor parte del agua haya destilado, entonces aumentar la velocidad de destilación a 4 gotas por segundo. Cuando el agua haya destilado por completo, lavar el interior del tubo del refrigerante con tolueno. Continuar la destilación durante 5 minutos, retirar la fuente de

calor, dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y arrastrar el agua que permanezca adherida a las paredes del tubo receptor. Cuando el agua y el tolueno se hayan separado completamente, leer el volumen de agua y calcular el porcentaje presente en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$100(V_2 - V_1)/P$$

en la cual P es el peso, en g, de la muestra a ensayar, V_1 es el volumen, en ml, de agua obtenido en la primera destilación y V_2 es el volumen total, en ml, de agua obtenido en las dos destilaciones.

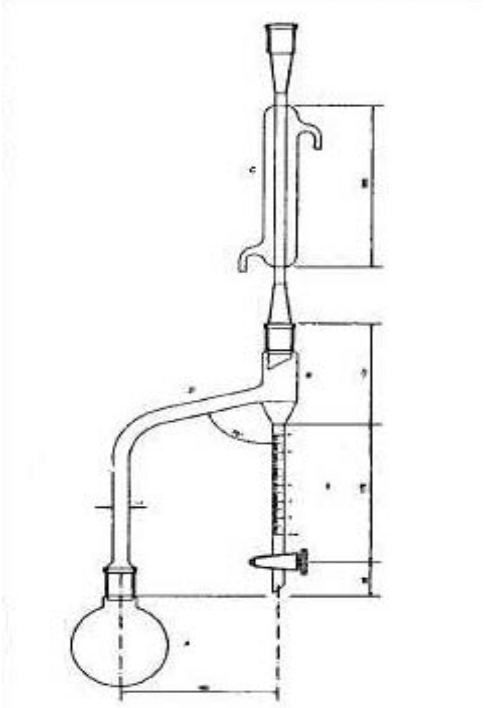


Figura. Aparato para la determinación de agua por destilación azeotrópica.

130. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, realizar la determinación de alcohol empleando el *Método I*.

Método I
Destilación

Este método es apropiado para la mayoría de los extractos fluidos y tinturas. En todas las manipulaciones, deben tomarse precauciones para reducir al mínimo la pérdida de alcohol por evaporación.

Procedimiento general - Medir exactamente no menos de 25 ml del líquido en el cual se quiere valorar el alcohol y registrar la temperatura a la cual se midió el volumen. Transferirlos a un destilador apropiado (de volumen dos a cuatro veces mayor que el del líquido) y si se cree que el contenido alcohólico no es superior al 30 % v/v agregar un volumen igual de agua lavando al mismo tiempo la probeta en que se midió. Destilar a una velocidad tal que el líquido pase claro y recolectar un volumen inferior, en unos 2 ml, al volumen del líquido original. Llevar a la temperatura inicial, completar exactamente al volumen inicial con agua y determinar la densidad relativa a 1 5 °C (ver *160. Determinación de la densidad relativa*). Por medio de la tabla correspondiente (ver *Determinación de la concentración alcohólica en peso y en volumen de agua,* en *Tablas*) calcular el porcentaje, en volumen, de alcohol contenido en el líquido ensayado. Si el líquido bajo ensayo contiene más de 30 % v/v de alcohol, diluir con dos veces su volumen de agua y recolectar 2 ml menos que, el doble del volumen primitivo. Llevar a la temperatura inicial y completar cuidadosamente al doble del volumen inicial con agua, mezclar y determinar la densidad relativa y el contenido alcohólico según se mencionó anteriormente. El contenido alcohólico en volumen debe corresponder a l a mitad del contenido en el líquido original. El destilado debe ser límpido o ligeramente turbio.

El método debe modificarse en los siguientes casos:

Ebullición violenta - Algunas soluciones alcohólicas, particularmente las que contienen resinas, manifiestan tendencia a p roducir proyecciones cuando se calientan. En estos casos agregar trozos de algún material poroso que permita regular la ebullición.

Líquidos espumosos - Deben acidificarse con ácido fosfórico, sulfúrico o tánico, o tratarse con un pequeño exceso de solución de cloruro de calcio.

Glicerina - Los líquidos que contienen glicerina deben diluirse con agua como para que el residuo de la destilación contenga por lo menos 50 % de agua.

Iodo - Las soluciones iodadas deben decolorarse antes de ser destiladas, por agregado de cinc en polvo o de solución de tiosulfato de sodio (1 en 10). En este último caso debe evitarse un exceso de tiosulfato de sodio y conviene agregar unas gotas de hidróxido de sodio (SR) para fijar los compuestos volátiles de azufre.

Sustancias volátiles - Las tinturas, alcoholados y demás preparados alcohólicos que contengan en cantidad apreciable sustancias volátiles, tales como esencias, cloroformo, éter, alcanfor, etc., deben tratarse previamente de la siguiente forma: mezclar 25 ml del líquido alcohólico en una ampolla de decantación, con un volumen igual de solución saturada de cloruro de sodio; agregar aproximadamente el mismo volumen de éter de petróleo y agitar la mezcla para extraer los compuestos volátiles. Dejar reposar, retirar la fase inferior acuosa y transvasar a una segunda ampolla. Extraer dos veces con porciones de 25 ml de éter de petróleo. Reunir estos extractos en la primera ampolla y extraer con tres porciones de 10 ml de solución saturada de cloruro de sodio.

Mezclar los extractos acuosos salinos y destilar en la forma habitual, recolectando un volumen de destilado que tenga una relación simple con el volumen del líquido original.

Si el líquido, después de tratado con éter de petróleo, queda lechoso, destilar directamente una nueva porción de la muestra, diluida con un volumen igual de agua, siguiendo el *Procedimiento general*. Tratar este destilado como se indicó anteriormente, con éter de petróleo y solución saturada de cloruro de sodio y destilar la solución acuosa salina. Así se obtendrá un destilado exento de sustancias volátiles extrañas.

Si se tiene que destilar una solución de colodión, se debe diluir con agua en lugar de solución saturada de cloruro de sodio.

Cuando las esencias están presentes en pequeña proporción y se obtiene un destilado turbio, si no se ha empleado el tratamiento previo con éter de petróleo, bastará agitar el destilado con un quinto de su volumen de éter de petróleo para clarificarlo o filtrarlo a través de una delgada capa de talco.

Otros preparados que requieren un tratamiento especial - Las preparaciones que contengan bases volátiles deben acidificarse ligeramente con ácido sulfúrico diluido antes de ser destiladas. Si están presentes ácidos volátiles, se debe alcalinizar

ligeramente la preparación con hidróxido de sodio al 4 %.

Las soluciones jabonosas se tratan con un exceso de ácido sulfúrico para descomponer el jabón, se extraen con éter de petróleo purificado y luego se continúa según se indica en *Procedimiento general*.

Método II
Cromatografía de gases

Sistema cromatográfico - Emplear un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización a la llama y una columna de vidrio de 1,8 m x 4 mm rellena con un copolímero de etilvinilbenceno y divinilbenceno con un área superficial nominal de 500 a 600 m^2 por g y un diámetro de poro promedio de 0,0075 µm de malla N° 100 a 120. Se emplea nitrógeno o helio como gas transportador. Antes de usar, acondicionar la columna durante la noche a 235 °C con flujo lento de gas transportador. Mantener la columna a 120 °C y el inyector y el detector a 210 °C. Ajustar el caudal del gas transportador de manera que el estándar interno (acetonitrilo) eluya entre 5 y 10 minutos.

Solución estándar - Diluir 5,0 ml de alcohol absoluto con agua a 250 ml.

Solución del estándar interno - Diluir 5,0 ml de acetonitrilo con agua a 250 ml.

Solución muestra - Diluir la muestra a ensayar con agua hasta obtener una solución que contenga aproximadamente 2 % v/v de alcohol.

Preparación muestra - Transferir 10 ml de la *Solución muestra* y 10 ml de la *Solución del estándar* interno a un matraz aforado de 100 ml y completar a volumen con agua.

Preparación estándar - Transferir 10 ml de la *Solución estándar* y 10 ml de la *Solución del estándar* interno a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con agua y mezclar.

Aptitud del sistema - (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, *R*, no debe ser menor de 2; el factor de asimetría para el pico del alcohol no debe ser mayor que 1,5 y la desviación estándar relativa del cociente entre las respuestas de los picos del alcohol y el estándar interno para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 2,0 %.

Procedimiento - Inyectar por duplicado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 5 µl) de la *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos. Calcular el porcentaje de alcohol, en volumen, en la muestra, por la fórmula siguiente:

$$2DR_M / R_E$$

en la cual *D* es el factor de dilución, expresado como una fracción, empleado en la preparación de la *Solución muestra* y R_M y R_E son los cocientes entre las respuestas de los picos de alcohol y del estándar interno obtenidos a partir de *Preparación muestra* y la *Preparación estándar*, respectivamente.

140. DETERMINACIÓN DE ALUMINIO

Este procedimiento se emplea para demostrar que el contenido de aluminio (Al) no es mayor al límite especificado en la monografía correspondiente de una sustancia indicada para emplearse en hemodiálisis. [NOTA: las *Soluciones estándar* y *la Solución muestra* pueden modificarse, si fuera necesario, para obtener soluciones de concentraciones apropiadas adaptables al intervalo lineal o de trabajo del aparato].

Ácido nítrico diluido - Transferir 40 ml de ácido nítrico a un matraz aforado de 1 litro y completar a volumen con agua.

Soluciones estándar - Transferir 2,0 g de aluminio metálico a un matraz aforado de 1 litro, agregar 50 ml de ácido clorhídrico 6 N, agitar por rotación y dejar que reaccione hasta que todo el aluminio se haya disuelto. Completar con agua a volumen y mezclar. Transferir 5,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 1 litro, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 10,0 ml de esta solución a un matraz aforado de 100 ml, completar a volumen con *Acido nítrico diluido* y mezclar. Transferir porciones de 1,0; 2,0 y 4,0 ml de esta solución a sendos matraces aforados de 100 ml, completar a volumen con *Ácido nítrico diluido* y mezclar. Estas soluciones contienen 0,01; 0,02 y 0,04 µg por ml, respectivamente.

Solución muestra - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, transferir una cantidad de muestra, en g, exactamente pesada, a un matraz aforado de plástico de 100 ml. Agregar 50 ml de agua y sonicar durante 30 minutos. Agregar 4 ml de ácido nítrico, completar con agua a volumen y mezclar.

Procedimiento - Determinar las absorbancias de las *Soluciones estándar* y la *Solución muestra* en la línea de emisión del aluminio a 309,3 nm con un espectrofotómetro de absorción atómica apropiado (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*) equipado con una lámpara de aluminio de cátodo hueco y un horno eléctrico sin llama, empleando *Ácido nítrico diluido* como blanco. Graficar las absorbancias de las *Soluciones estándar* en función del contenido de Al, en µg por ml, y trazar la línea que mejor se ajuste. A partir del gráfico obtenido, determinar la cantidad, en µg, de Al en cada ml de la *Solución muestra*. Calcular la cantidad de Al en la muestra, en µg por g, multiplicando este valor por $100/P$, donde P es el peso, en g, de la sustancia tomada para preparar la *Solución muestra*.

150. DETERMINACIÓN DE CINC

Todos los reactivos empleados en este ensayo deben tener un contenido de metales pesados tan bajo como sea posible. El material de vidrio debe lavarse cuidadosamente, primero con una solución de ácido nítrico al 50 % a una temperatura entre 35 y 55 °C y finalmente con agua. El lubricante empleado en el robinete de la ampolla de decantación no debe ser soluble en cloroformo.

Reactivos

Solución alcalina de citrato de amonio - Disolver 50 g de citrato dibásico de amonio en cantidad suficiente de agua hasta completar 100 ml. Agregar 100 ml de amoníaco y separar los metales pesados que pudieran estar presentes, extrayendo la solución con porciones de 20 ml de *Solución de ditizona para extracción* (ver *600. Límite de plomo*), hasta que esta solución conserve su color anaranjado verdoso. Extraer la ditizona que quede en la solución de citrato por agitación con cloroformo.

Cloroformo - Destilar cloroformo en un aparato de vidrio y recolectar el destilado en cantidad suficiente de alcohol absoluto de modo que la concentración final sea de 1 ml de alcohol por cada 100 ml de destilado.

Solución de ditizona - Solución estándar de ditizona (ver 600. Límite de plomo) preparada con *Cloroformo* destilado.

Solución estándar de cinc - Disolver 625 mg de óxido de cinc, previamente sometido a ignición moderada, hasta peso constante y exactamente pesado, en 10 ml de ácido nítrico y diluir con agua a 500,0 ml. Cada mililitro de esta solución contiene 1,0 mg de cinc.

Solución estándar de cinc diluida - A 1 ml de *Solución estándar de cinc*, exactamente medido, agregar dos gotas de ácido nítrico y diluir con agua a 100 ml. Cada mililitro de esta solución contiene 10 µg de cinc. Esta solución debe emplearse dentro de las 2 semanas de preparada.

Solución de ácido tricloroacético - Disolver 100 g de ácido tricloroacético en cantidad suficiente de agua y diluir a 1 litro.

Procedimiento - Transferir entre 1 y 5 ml de la preparación a ensayar, exactamente medidos, a un tubo de centrífuga graduado de 40 ml y, si fuera necesario, agregar ácido clorhídrico 0,2 N, gota a gota, hasta obtener una solución transparente. Agregar 5 ml de *Solución de ácido tricloroacético* y completar con agua 40,0 ml. Mezclar y centrifugar.

Transferir un volumen exactamente medido del líquido sobrenadante, que contiene aproximadamente entre 5 y 20 µg de cinc, a una ampolla de decantación de vidrio y agregar agua hasta completar 20 ml. Agregar 1,5 ml de *Solución alcalina de citrato de amonio* y 35 ml de *Solución de ditizona* (ver *600. Límite de plomo*). Agitar vigorosamente unas cien veces, dejar que se separe la fase clorofórmica e insertar una torunda de algodón en el vástago de la ampolla de decantación para eliminar el agua que se haya emulsionado con el cloroformo. Recolectar el extracto clorofórmico (desechando la primera porción) en un tubo de ensayo y determinar la absorbancia a 530 nm, empleando un espectrofotómetro apropiado.

Calcular la cantidad de cinc contenida en la muestra, a partir de una curva de absorbancia en función de concentración, obtenida empleando 0,5; 1,0 y 1,5 ml de *Solución estándar de cinc diluida* y, en caso que el contenido de la muestra sea mayor de 15 µg, emplear 2,0 ml de *Solución estándar de cinc diluida*, corregida mediante un blanco preparado simultáneamente con todos los reactivos empleados en las mismas proporciones, pero sin agregar cinc.

160. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, la determinación de la densidad relativa se realiza a 20 °C.

Procedimiento - Emplear un picnómetro perfectamente seco. Determinar el peso del picnómetro vacío y el peso de agua contenida en el picnómetro, recientemente hervida y enfriada a 20 °C. Al peso obtenido, sustraer el peso del picnómetro vacío. Llenar el picnómetro con la sustancia a ensayar a 20 °C. Ajustar la temperatura del picnómetro lleno a la misma temperatura, eliminar el exceso de líquido y pesar. Al peso obtenido, sustraer el peso del picnómetro vacío.

[NOTA: si el picnómetro contiene menos de 20 ml, las pesadas deben efectuarse con una aproximación de ± 0,001 g; y si contiene más de 20 ml, con una aproximación de ± 0,01 g].

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, la densidad relativa de la sustancia es el cociente entre el peso de la sustancia contenida en el picnómetro menos el peso del picnómetro vacío y el peso de agua contenida en el mismo menos el peso del picnómetro vacío.

170. DETERMINACIÓN DE LA ROTACIÓN ÓPTICA

Una sustancia se considera ópticamente activa cuando posee la propiedad de rotar el plano de la luz polarizada que incide sobre la misma. Esta propiedad, característica de muchas sustancias, es en general debida a la presencia de uno o varios centros asimétricos constituidos muy frecuentemente por átomos de carbono con cuatro sustituyentes diferentes. El número máximo de isómeros ópticos posibles en una molécula es de 2^n, siendo n el número de centros asimétricos.

La polarimetría es una técnica conveniente para distinguir entre sí, isómeros ópticamente activos, a partir de la medición de la rotación óptica de una sustancia; también es un criterio importante de identidad y pureza, pudiendo emplearse con fines cuantitativos.

Las sustancias quirales poseen poder rotatorio. Aquellas que rotan la luz en el sentido de las agujas del reloj son dextrógiras o isómeros ópticos (+), mientras que las que rotan la luz en la dirección opuesta son levógiras o isómeros ópticos (-). Los símbolos *R* y *S* se emplean actualmente para indicar la configuración, es decir el ordenamiento de átomos o grupos de átomos en el espacio, pudiendo en algunos casos emplearse otros términos como *D* y *L* o α y β.

Las sustancias quirales cuyas moléculas no son superponibles sino imágenes especulares se denominan enantiómeros. Éstos tienen las mismas propiedades fisicoquímicas, excepto que rotan el plano de la luz polarizada la misma cantidad de grados en direcciones opuestas, y sus reacciones con otras sustancias quirales presentan características diferentes.

La medición de la rotación óptica debe realizarse empleando un polarímetro capaz de apreciar diferencias de 0,01°. Como fuente de luz de los aparatos se emplean lámparas de sodio, de vapor de mercurio, xenón o halógeno-tungsteno entre otras, provistas de un dispositivo que permite transmitir un haz luminoso monocromático. La calibración del aparato puede realizarse empleando una placa de cuarzo montada sobre un soporte perpendicular al paso de la luz. La ecuación general es:

$$[\alpha]_{\lambda}^{t} = 100a / lc$$

en la cual [α] es la rotación específica a la longitud de onda λ, t es la temperatura a la que se realiza la lectura, a es la rotación observada en grados, l es el paso de la celda en decímetros y c es la concentración del analito, en g por 100 ml. Por lo tanto, [α] es 100 veces el valor medido, en grados, para una solución que contiene 1 g en 100 ml, medido en una celda con un paso de 1,0 dm bajo determinadas condiciones de longitud de onda incidente y temperatura. En general, la rotación observada decrece linealmente con el aumento de la temperatura; sin embargo, la diferencia entre la rotación observada a 20 y 25 °C es generalmente despreciable.

La rotación óptica es afectada por el solvente empleado para la medición, la concentración del analito, la longitud de onda y la temperatura, los que siempre deberán especificarse. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, las determinaciones en esta Farmacopea se realizan a 25 °C, empleando la línea D del sodio a la longitud de onda de 589 nm. La rotación específica así determinada se expresa por el símbolo:

$$[\alpha]_{D}^{25}$$

Para algunas sustancias, especialmente líquidos de composición compleja, como por ej., aceites esenciales, la rotación óptica se expresa en función de la rotación observada, a, medida bajo las condiciones definidas en la monografía correspondiente.

La polarimetría puede realizarse empleando aparatos que detectan la rotación angular de modo visual (al igualar la intensidad de luz sobre dos campos) o mediante un sistema fotoeléctrico, siendo esta última más exacta y precisa que la medición visual.

El empleo de longitudes de onda menores, como por ej., las líneas de la lámpara de mercurio a 578, 546, 436, 405 y 365 nm en un polarímetro fotoeléctrico, puede proporcionar ventajas en cuanto a la sensibilidad, con la consiguiente reducción de la concentración del analito. En general, la rotación óptica observada a 436 nm, es aproximadamente el doble y a 365 nm aproximadamente tres veces la observada con la línea D del sodio. La reducción de la concentración del analito requerida para la medición, a veces puede realizarse al convertir la sustancia a ensayar en una que tenga una rotación óptica significativamente mayor.

Rotación específica - Se calcula a partir de la rotación óptica observada en la solución muestra, obtenida según se especifica en la monografía correspondiente. Cuando se emplea un polarímetro fotoeléctrico se hace una sola medición, corregida por el blanco de solvente. Cuando se emplea un

polarímetro con detección visual se obtiene un promedio entre no menos de cinco determinaciones corregidas por la lectura de un tubo vacío y seco, empleado como blanco. La temperatura de la muestra debe mantenerse dentro de ± 0,5 °C del valor establecido. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, la rotación específica se calcula sobre la sustancia seca cuando la monografía especifica *Pérdida por secado* o sobre la sustancia anhidra cuando especifica *Determinación de agua.*

La rotación óptica de las soluciones se debe determinar dentro de los 30 minutos de realizadas las soluciones. En el caso de sustancias que pueden sufrir racemización o mutarrotación se deben tomar precauciones para estandarizar el tiempo entre el agregado del analito al solvente y la lectura polarimétrica.

Rotación angular - Cuando se trata de mezclas, la rotación angular constituye una determinación física importante. Representa la desviación polarimétrica que una sustancia líquida o una solución, en determinadas condiciones de temperatura, concentración y longitud del tubo del polarímetro, hacen experimentar al plano de polarización de la luz monocromática incidente. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, la misma se mide en un tubo de 1,0 dm, corrigiéndose la lectura con la de un tubo vacío y seco, empleado como blanco.

180. DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA DE SOLIDIFICACIÓN

Aparato (ver *Figura*) - Consta de un tubo de ensayo de 25 mm x 150 mm colocado dentro de un tubo de ensayo de 40 mm x 160 mm; el tubo interior está cerrado con un tapón que sostiene el termómetro y un agitador. El bulbo del termómetro se encuentra a aproximadamente 15 mm del fondo del tubo. El conjunto se coloca dentro de un vaso de precipitados que contiene un líquido refrigerante apropiado y un termómetro para controlar la temperatura del mismo.

Procedimiento - Emplear un termómetro que se ajuste a las características dadas en *<720>. Termómetros*. Transferir una cantidad de muestra, previamente fundida si fuera necesario, al tubo interno, de manera que el bulbo del termómetro quede totalmente cubierto. Determinar el punto de solidificación aproximado enfriando rápidamente. Colocar el tubo interno en un baño a una temperatura 5 °C por encima del punto de solidificación de la sustancia hasta que prácticamente toda la muestra se funda y sólo queden trazas de cristales.

Llenar el vaso de precipitados con el líquido refrigerante a una temperatura 5 °C por debajo del punto de solidificación de la sustancia. Insertar el tubo interno dentro del tubo externo, asegurándose que la muestra presente algunos cristales y agitar, moviendo el agitador verticalmente, hasta que se produzca la solidificación. La mayor temperatura observada corresponde a la temperatura de solidificación.

En el caso en que la muestra se encuentre en estado líquido a temperatura ambiente, llevar a cabo la determinación empleando un baño a una temperatura aproximadamente 15 °C por debajo del punto de solidificación esperado.

Cuando la muestra se enfría cerca de 5 °C por encima del punto de solidificación esperado, ajustar el baño a una temperatura entre 7 y 8 °C debajo del punto de solidificación esperado. Agitar la muestra hasta terminar el ensayo a una velocidad regular de 20 ciclos completos por minuto.

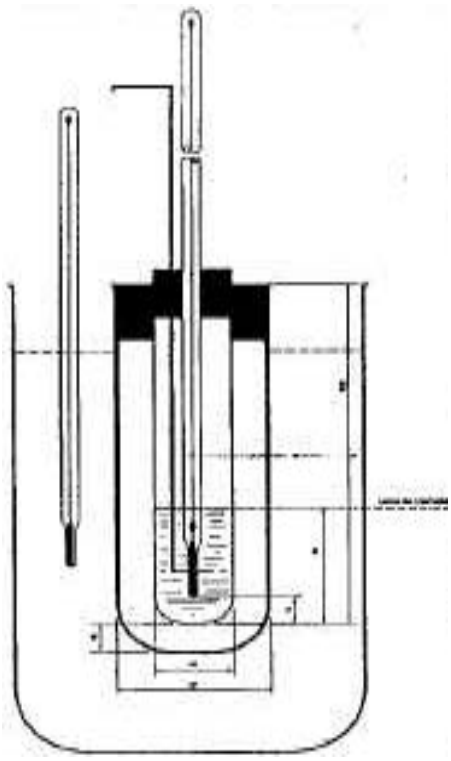


Figura. Aparato para la determinación de la temperatura de solidificación.

190. DETERMINACIÓN DE LA VISCOSIDAD

La viscosidad es una propiedad de los líquidos íntimamente vinculada con la resistencia al flujo. Se define como la fuerza requerida para mover en forma continua una superficie plana sobre otra, bajo condiciones específicas constantes, cuando el espacio entre ambas está ocupado por un líquido.

La viscosidad se puede expresar en términos de viscosidad absoluta, η, que se define como la fuerza por unidad de área necesaria para mantener una unidad de gradiente de velocidad. Las unidades básicas son el *poise* y *centipoise* (siendo 1 *poise* = 100 *centipoise*).

En lugar de expresar los resultados en términos de viscosidad absoluta, muchos métodos de determinación permiten medir la viscosidad relativa, es decir la viscosidad de un líquido comparada con la de otro líquido de viscosidad conocida. Como las viscosidades relativas que se obtienen con los diferentes aparatos no son las mismas, se ha adoptado expresar la viscosidad como viscosidad cinemática, que es la relación entre la viscosidad absoluta, expresada en *poise*, y la densidad del líquido a la misma temperatura, es decir, viscosidad cinemática (stoke) = viscosidad dinámica (poise)/densidad (g/ml). Las unidades de viscosidad cinemática son el *stoke* y *centistoke* (siendo 1 *stoke* = 100 *centistoke*).

Medición de la viscosidad - Para la medición de la viscosidad pueden emplearse dos tipos de aparatos:

Viscosímetro de tubo capilar: determina el tiempo requerido para que un volumen dado de un líquido escurra, a través de un capilar. Este se denomina viscosímetro de Ostwald o de Ubbelohde.

Viscosímetro rotatorio: mide las fuerzas de cizallamiento (fuerza tangencial por unidad de superficie) en el seno de un líquido situado entre dos cilindros coaxiales de radios R_A y R_B , uno de los cuales se mueve por un motor, mientras que el otro se desliza debido a la rotación del primero. Este se denomina viscosímetro de Brookfield, de rotovisco o de Stormer.

En la monografía correspondiente se indicará el tipo de aparato empleado para la medición de la viscosidad.

Calibración de los viscosímetros de tipo capilar - Determinar la constante del viscosímetro, *k*, para cada viscosímetro, empleando el líquido calibrador especificado por el fabricante.

Viscosímetro de Ostwald - Llenar el tubo con la cantidad exacta de líquido especificada por el fabricante (ajustado a 20,0 ± 0,1 °C). Ajustar el menisco de la columna de líquido en el tubo capilar al nivel de la línea graduada superior con la ayuda de presión o succión. Abrir el tubo de llenado y el tubo capilar para que el líquido escurra contra la presión atmosférica. [NOTA: una falla al abrir cualquiera de estos tubos producirá valores erróneos]. Registrar el tiempo necesario, en segundos, mediante un cronómetro para que el líquido escurra de la marca superior a la marca inferior en el tubo capilar.

Viscosímetro de Ubbelohde - Colocar una cantidad de líquido en el tubo de llenado (ajustado a 20,0 ± 0,1°C) y transferirlo al tubo capilar mediante succión suave evitando la formación de burbujas en el líquido, manteniendo el tubo de aire cerrado. Ajustar el menisco de la columna de líquido en el tubo capilar al nivel de la línea graduada superior. Abrir el tubo de aire y el tubo capilar para permitir que el líquido escurra contra la presión atmosférica. [NOTA: una falla al abrir el tubo de aire antes que el tubo capilar producirá valores erróneos]. Registrar el tiempo necesario, en segundos, mediante un cronómetro para que el líquido escurra de la marca superior a la marca inferior en el tubo capilar.

Cálculos - Calcular la constante del viscosímetro, *k*, mediante la fórmula siguiente:

$$k = \eta / dt$$

en la cual η es la viscosidad, en centipoise, del líquido de viscosidad conocida, *d* es la densidad relativa del líquido empleado a 20 °C (ver *160. Determinación de la densidad relativa*) y *t* es el tiempo, en segundos, para que el líquido escurra de la marca superior a la marca inferior.

[NOTA: cuando un viscosímetro se repara, debe calibrarse nuevamente. Aún las reparaciones menores causan, frecuentemente, cambios significativos en el valor de su constante, *k*].

Determinación de la viscosidad mediante el Viscosímetro de Tubo Capilar - La determinación de la viscosidad se efectúa a una temperatura de 20,0 ± 0,1 °C, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

El ensayo no es válido si dos lecturas consecutivas difieren más de 1 %. La media de tres lecturas, como mínimo, da el tiempo de vertido del líquido desconocido.

Se calcula la viscosidad absoluta, η, en centipoise, mediante la fórmula siguiente:

$$\eta = kdt$$

en la cual k es la constante del aparato, d es la densidad del líquido desconocido y t es el tiempo de escurrimiento del líquido desconocido.

Procedimiento (ver *Figura*) - Llenar el viscosímetro por el tubo *L*, con una cantidad suficiente del líquido desconocido a 20 °C, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para llenar el bulbo *A*. Asegurar que el nivel del líquido en el bulbo *B*, está por debajo del orificio de ventilación del tubo *M*. Sumergir el viscosímetro en un baño de agua a 20,0 ± 0,1°C, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Mantenerlo en posición vertical y dejar reposar durante 30 minutos para establecer el equilibrio térmico. Cerrar el tubo *M*, y elevar el nivel del líquido en el tubo *N*, hasta que se sitúe a 8 mm aproximadamente por encima de la marca *E*. Mantener el líquido en este nivel, cerrando el tubo *N*, y abriendo el tubo *M*. Abrir el tubo *N*, y medir mediante un cronómetro, con una aproximación de 1/5 segundo, el tiempo necesario para que el nivel del líquido descienda de la marca *E* a la marca *F*.

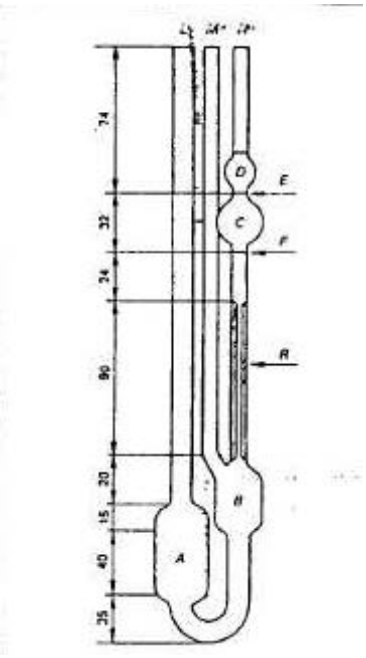


Figura. Viscosímetro de tubo capilar (las dimensiones son en mm).

Determinación de la viscosidad mediante el Viscosímetro Rotatorio - La determinación de la viscosidad se efectúa a una temperatura de 20,0 ± 0,1 °C, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Muchas sustancias presentan viscosidad variable según estén en reposo o en movimiento y la mayoría de ellas son menos resistentes al flujo a velocidades altas. En dichos casos, en la monografía correspondiente se indica el viscosímetro a emplear y la velocidad angular a la que debe determinarse la viscosidad.

La determinación de la viscosidad absoluta se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\eta = \frac{1}{\omega}\left(\frac{M}{4.\pi.h}\right).\left(\frac{1}{R_A^2} - \frac{1}{R_B^2}\right)$$

en la cual h representa la altura de inmersión del cilindro que se desliza en el medió líquido, R_A y R_B representan los radios de los cilindros siendo R_A menor que R_B, ω representa la velocidad angular y M representa el ángulo de desviación del cilindro que se desliza. Si se determina la constante, k, del aparato la η se calcula mediante la siguiente fórmula simplificada:

$$\eta = k\frac{M}{\omega}$$

Procedimiento - Determinar la viscosidad siguiendo las instrucciones del aparato.

200. DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO

Método I

En ausencia de nitratos y nitritos

Transferir aproximadamente 1 g de la sustancia en ensayo, exactamente pesada, a un balón de Kjeldahl, de vidrio duro al borosilicato, de 500 ml.

Si la sustancia en ensayo es sólida o semisólida, envolverla en una hoja de papel de filtro exento de nitrógeno para poder introducirla fácilmente en el balón.

Agregar 10 g de sulfato de potasio pulverizado o de sulfato de sodio anhidro, 0,5 g de sulfato cúprico pulverizado y 20 ml de ácido sulfúrico. Inclinar el balón con un ángulo de aproximadamente 45° y calentar suavemente, manteniendo la temperatura por debajo del punto de ebullición de la mezcla hasta que no se produzca espuma. Aumentar la temperatura gradualmente hasta ebullición y continuar calentando hasta que la solución presente un color verde claro o casi incoloro y luego continuar el calentamiento durante 30 minutos. Dejar enfriar, agregar de a poco 150 ml de agua, mezclar cuidadosamente y enfriar nuevamente. Agregar con precaución 100 ml de hidróxido de sodio al 40 %, dejándolo resbalar por la pared interna del balón, de tal manera que forme una capa por debajo de la solución ácida. Agregar trozos de cinc granulado y conectar el balón por medio de una ampolla de Kjeldahl, con un refrigerante cuyo extremo Iibre esté sumergido en 100 ml de una solución ende ácido bórico al 4 %, contenida en un erlenmeyer de 500 ml. Mezclar suavemente el contenido del balón de Kjeldahl y destilar hasta que hayan pasado aproximadamente las dos terceras partes del líquido. Agregar al destilado cinco gotas de solución de rojo de metilo (SR) como indicador y valorar el exceso de ácido con hidróxido de sodio 0,5 N (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de ácido clorhídrico o sulfúrico 0,5 N equivale a 7,004 mg de nitrógeno.

Cuando el contenido en nitrógeno es bajo, el ácido clorhídrico o sulfúrico 0,5 N debe ser reemplazado por una solución 0,1 N y el exceso se debe valorar con solución alcalina 0,1 N. Cada mililitro de ácido clorhídrico o sulfúrico 0,1 N equivale a 1,4008 mg de nitrógeno.

En presencia de nitritos y nitratos

Transferir una cantidad de sustancia, exactamente pesada, equivalente a 0 ,15 g de nitrógeno a un balón de Kjeldahl al borosilicato de 500 ml. Agregar 25 ml de ácido sulfúrico que contengan 1 g de ácido salicílico disuelto. Mezclar cuidadosamente el contenido del balón y dejar reposar la mezcla durante 30 minutos; agitado frecuentemente. Agregar a la mezcla 5 g de tiosulfato de sodio pulverizado y mezclar Agregar 0,5 g de sulfato cúprico pulverizado y proceder según se indica en *En ausencia de nitratos y nitritos*, comenzando donde dice "*inclinar el balón con un ángulo de aproximadamente 45°...*".

[NOTA: cuando el contenido de nitrógeno de la sustancia en ensayo es superior a 10 %, pueden agregarse entre 500 mg a 1 g de ácido benzoico, antes de la digestión, para facilitar la descomposición de la sustancia. Este método no debe emplearse para ciertos alcaloides y compuestos orgánicos nitrogenados que no ceden todo su nitrógeno por digestión con ácido sulfúrico].

Método II

Aparato (ver *Figura*) - Debe construirse completamente con vidrio duro. El balón de digestión y destilación *A*, es un balón de 200 ml, con un cuello de aproximadamente 12 cm de largo. El generador de vapor *B*, es un balón de Kjeldahl de 1 litro. La alargadera de destilación *C*, sirve para retener gotitas y para introducir el álcali y el vapor en el balón *A*. El tubo *D*, provisto de un embudo en su extremo superior; sirve como válvula dé seguridad para el balón *B* y permite la reposición de agua. El tubo de salida *I*, tiene un orificio en el punto *K* para evitar obstrucciones por el vapor que se condensa. El refrigerante *L*, tiene una camisa de 30 a 40 cm de largo y está dispuesto de modo que la extremidad inferior del tubo refrigerante *J*, cortada a bisel, se sumerja en la solución del recipiente de absorción *M*, el cual tiene una capacidad de 250 a 300 ml.

En caso de no poseer uniones esmeriladas emplear tapón de goma.

El tapón de goma, empleado para unir el balón de digestión al aparato de destilación, debe lubricarse con glicerina.

Todo el material de goma empleado debe hervirse, durante 10 minutos, en una mezcla de hidróxido de sodio (SR) y agua (50:50) y lavarse abundantemente con agua hasta reacción neutra antes de emplearse por primera vez.

Llenar el generador de vapor *B*, con agua a la cual se han agregado unas gotas de ácido sulfúrico y poner en el generador fragmentos de material poroso para evitar una ebullición violenta. Antes de comenzar una serie de análisis, hacer pasar una corriente de vapor de agua por el aparato, cuyo balón de digestión debe contener 30 ml de hidróxido de sodio al 40 %. Transferir al recipiente de absorción *M*, 15 ml de una solución de ácido bórico al 4 %, tres gotas de solución de rojo de metilo (SR) como indicador y cantidad suficiente de agua para cubrir el extremo abierto del tubo refrigerante *J*. Recolectar entre 80 y 100 ml de destilado y valorar con ácido sulfúrico 0,01 N, para obtener el factor de corrección que debe aplicarse a cada ensayo.

Reservar los matraces de absorción para este uso exclusivamente y, después de emplearlos, lavarlos abundantemente con agua hasta reacción neutra; tapar perfectamente y guardar hasta su próximo empleo.

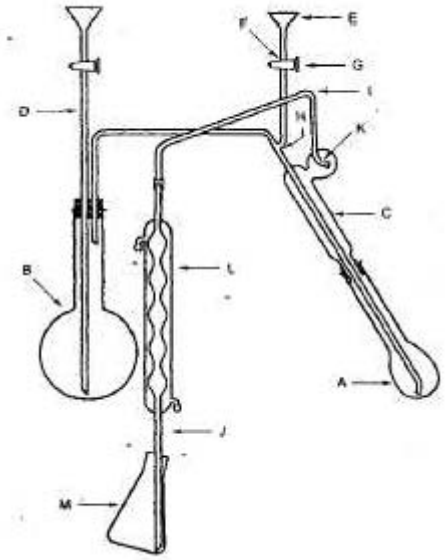


Figura. Aparato para la determinación de nitrógeno.

Procedimiento - Transferir al balón de digestión *A*, una cantidad de sustancia en ensayo, exactamente pesada o medida, de tal manera que contenga entre 2 y 3 mg de nitrógeno. Agregar 1 g de una mezcla pulverizada de sulfato de potasio y sulfato de cúprico (10:1) y arrastrar hacia el interior las partículas de sustancia que se hayan adherido al cuello del balón, con ayuda de agua. Agregar 7 ml de ácido sulfúrico, dejándolos resbalar por las paredes del balón, y luego, mientras se agita el balón con movimiento circular, agregar cuidadosamente 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % a lo largo de las paredes del balón. [NOTA: no debe agregarse el peróxido de hidrógeno durante el proceso de digestión]. Calentar el balón directamente sobre la llama del mechero o sobre un calentador eléctrico hasta que la solución adquiera un color azul claro y las paredes del balón queden libres de residuo carbonoso. Agregar al producto de la digestión, 70 ml de agua, enfriar y conectar el balón de digestión al aparato de destilación. Agregar a través del embudo *E*, 30 ml de hidróxido de sodio al 40 %, lavar el embudo con 10 ml de agua, cerrar perfectamente el robinete *G* y comenzar inmediatamente la destilación con vapor. Recolectar el destilado sobre 15 ml de una solución acuosa de ácido bórico al 4 %, a la cual se han agregado tres gotas de solución de rojo metilo (SR) como indicador y cantidad suficiente de agua, hasta cubrir el extremo abierto del tubo del refrigerante. Continuar la destilación hasta obtener entre 80 y 100 ml de destilado. Retirar el recipiente de absorción, lavar el extremo del tubo del refrigerante con una pequeña porción de agua y valorar el

destilado con ácido sulfúrico 0,01 N (SV). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de ácido sulfúrico 0,01 N (SV) equivale a 0,1401 mg de nitrógeno. Si la cantidad de sustancia en ensayo contiene más de 2 a 3 mg de nitrógeno, se debe emplear para la titulación ácido sulfúrico 0,02 o 0,1 N, eligiéndose la concentración de ácido apropiada de modo que se consuman por lo menos 15 ml en la titulación. Si el peso total de la materia seca empleada es mayor a 0 ,1 g, aumentar proporcionalmente las cantidades de ácido sulfúrico y de hidróxido de sodio.

210. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EXTRAÍBLE DEL ENVASE

Los siguientes ensayos están diseñados para garantizar que las soluciones y suspensiones orales contenidas en envases multidosis, dispensadas como preparaciones líquidas o para reconstituir, y las soluciones inyectables en envases monodosis o multidosis, cuando se extraen de su envase original, proporcionen el volumen declarado en el rótulo del producto.

Para determinar el volumen extraíble del envase, seleccionar no menos de treinta envases y proceder según se indica para la forma farmacéutica correspondiente.

SOLUCIONES Y SUSPENSIONES ORALES, JARABES Y POLVOS EN ENVASES MULTIDOSIS, O SUSPENSIONES ORALES PARA RECONSTITUIR

Procedimiento - Seleccionar diez envases y proceder según se indica en el rótulo. Transferir el contenido de cada envase a s endas probetas graduadas y de capacidad tal que no exceda dos veces y media el volumen a medir, evitando la formación de burbujas y permitiendo que drenen durante un período no mayor de 30 minutos. Cuando el líquido quede libre de burbujas de aire, medir el volumen de cada uno.

Interpretación - El volumen promedio de la solución, suspensión o j arabe obtenido a partir de los diez envases no debe ser menor de 100% del volumen declarado en el rótulo y el volumen de ningún envase debe ser menor de 95 %. Debe repetirse el ensayo con veinte envases adicionales cuando:

a) El volumen promedio es menor de 100 % del declarado en el rótulo, pero el volumen de ningún envase es menor de 95 % de la cantidad declarada;

b) El volumen de no más de un envase es menor de 95 %; pero no menor de 90 % de volumen declarado en el rótulo.

El volumen promedio obtenido a partir de los treinta envases no debe ser menor de 100 % del volumen declarado en el rótulo y el volumen de no más de uno de los treinta envases puede ser menor de 95 %, pero no debe ser menor de 90 % del volumen declarado en el rótulo.

SOLUCIONES Y SUSPENSIONES INYECTABLES

Los envases de soluciones y suspensiones inyectables deben llenarse con un ligero exceso de volumen. Los excesos de volúmenes recomendados en la *Tabla* son generalmente suficientes para permitir la extracción y administración de los volúmenes declarados en el rótulo.

Procedimiento - Seleccionar uno o más envases si el volumen es mayor o igual a 10 ml, tres o más envases si es mayor a 3 ml y menor a 10 ml, y cinco o más envases si es menor o igual a 3 ml. Extraer individualmente el contenido de cada uno de los envases seleccionados con una jeringa hipodérmica seca cuya capacidad no exceda tres veces el volumen a ser medido, provista de una aguja de 0,8 mm de diámetro interno y de no menos de 2,5 cm de largo. Eliminar las burbujas de aire de la jeringa y de la aguja, verter el contenido de la jeringa sin vaciar la aguja en una probeta graduada y de capacidad tal que el volumen a medir ocupe por lo menos el 40 % de su volumen.

Alternativamente, el contenido de la jeringa puede ser transferido a u n vaso de precipitados seco, previamente pesado. Calcular el volumen extraído, en mililitros, como el peso, en gramos, de inyectable dividido por su densidad, previamente determinada.

El contenido de dos, tres o cuatro envases de 1 ó 2 ml puede combinarse para la medición, empleando una jeringa seca para cada envase. Para determinar el contenido de los envases de 10 ml o mayores, abrir los mismos y vaciar sus contenidos directamente en una probeta o en un vaso de precipitados previamente pesado.

El volumen no debe ser menor que el declarado en el rótulo; en el caso de envases examinados individualmente o en el caso de envases de 1 ó 2 ml, no debe ser menor que la suma de los volúmenes declarados de los envases seleccionados.

Para los inyectables en envases multidosis cuyo rótulo declare que se puede extraer un número específico de dosis de un determinado volumen, proceder según se indicó anteriormente empleando un número de jeringas igual al número de dosis especificadas. El volumen suministrado por cada jeringa no debe ser menor al de la dosis especificada.

Para los inyectables oleosos, calentar los envases a una temperatura no mayor a 3 7 °C y agitarlos cuidadosamente antes de extraer el contenido. Enfriar a 25 °C antes de medir el volumen extraído.

Para inyectables en jeringas prellenadas, armar el envase con los accesorios necesarios, como por ej., aguja o émbolo. Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente y sin vaciar la aguja,

presionar el émbolo lenta y constantemente para transferir el contenido de cada envase a un vaso de precipitados seco. Pesar y calcular el volumen extraíble. El volumen de cada envase no es menor que el declarado en el rótulo.

Para soluciones parenterales de gran volumen, seleccionar un envase y transferir el contenido en una probeta graduada y de capacidad tal que el volumen a medir ocupe por lo menos el 40 % de su volumen. El volumen no debe ser menor que el declarado en el rótulo.

Tabla.

Volumen declarado	Exceso de volumen recomendado	
(ml)	Líquidos móviles	Líquidos viscosos
0,5	0,10 ml	0,12 ml
1,0	0,10 ml	0,15 ml
2,0	0,15 ml	0,25 ml
5,0	0,30 ml	0,50 ml
10,0	0,50 ml	0,70 ml
20,0	0,60 ml	0,90 ml
30,0	0,80 ml	1,20 ml
50,0 o más	2 %	3 %

220. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO NETO DEL ENVASE

Los siguientes ensayos y especificaciones se aplican a p roductos tales como: cremas, geles, jaleas, lociones, ungüentos, pastas, polvos y aerosoles, incluidos los de válvula continua y los dosificadores, presurizados y no presurizados.

Procedimiento para formas farmacéuticas con excepción de aerosoles

Para envases rotulados por peso.

Seleccionar diez envases llenos y quitar todas las etiquetas que puedan afectar la determinación del contenido neto del envase. Limpiar y secar exteriormente los envases y pesar cada envase individualmente. Cortar cada envase y extraer cuantitativamente su contenido lavándolo con un solvente apropiado, si fuera necesario. Secar y pesar nuevamente cada uno de los envases vacíos junto con sus partes correspondientes. La diferencia entre el peso original y el peso del envase vacío es el peso del contenido neto del envase.

Para envases rotulados por volumen.

Verter el contenido de diez envases en sendas probetas y dejar que drenen completamente. Determinar el volumen de cada uno de los diez envases.

Interpretación - El contenido neto promedio de los diez envases no debe ser menor que el declarado y el contenido neto de cualquier envase individual no debe ser menor de 90 % de la cantidad declarada cuando la cantidad declarada es menor o igual a 60 g ó 60 ml; o no menor de 95 % de la cantidad declarada cuando la cantidad declarada es mayor a 60 g ó 60 ml.

Si no se cumple este requisito, determinar el contenido de veinte envases adicionales. El contenido promedio de los treinta envases no debe ser menor de la cantidad declarada y el contenido neto de no más de uno de los treinta envases puede ser menor de 90 % de la cantidad declarada cuando la cantidad declarada es menor o igual a 6 0 g ó 60 ml; o menor de 95 % de la cantidad declarada cuando la cantidad declarada es mayor a 6 0 g ó 60 ml.

Procedimiento para aerosoles

Seleccionar diez envases llenos y quitar todas las etiquetas que puedan afectar la determinación del contenido neto del envase. Limpiar y secar exteriormente los envases y pesar cada envase individualmente. Retirar el contenido de cada envase empleando una técnica apropiada, como por ej., enfriar para reducir la presión interna, retirar la válvula y verter.

Eliminar cualquier residuo con solventes apropiados y lavar con porciones de metanol. Calentar a 1 00 °C durante 5 minutos el envase, la válvula y todas las partes asociadas. Enfriar y pesar nuevamente cada envase completo. La diferencia entre el peso original y el peso del envase vacío es el peso del contenido neto del envase. Determinar el peso del contenido neto para cada envase ensayado. Los requisitos se cumplen si el contenido neto de cada uno de los diez envases no es menor que la cantidad declarada en el rótulo.

225. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE PERÓXIDOS

El índice de peróxidos I_p de una sustancia es el valor que expresa, en miliequivalentes de oxígeno activo, la cantidad de peróxidos presentes en 1.000 g de muestra.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, determinar el *Índice de peróxidos* por el *Método I.*

Método I

Procedimiento - Transferir aproximadamente 5,0 g de muestra a un erlenmeyer con tapón esmerilado de 250 ml, agregar 30 ml de una mezcla de ácido acético glacial y cloroformo (3:2), agitar hasta disolver y agregar 0,5 ml de una solución saturada de ioduro de potasio. Agitar exactamente durante 1 minuto, agregar 30 ml de agua y titular con tiosulfato de sodio 0,01 N (SV), agregado lentamente y sin dejar de agitar, hasta que el color amarillo desaparezca. Agregar 5 ml de almidón (SR) y continuar la titulación con tiosulfato de sodio 0,01 N (SV) agitando vigorosamente hasta que el color desaparezca. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver *Titulaciones residuales* en *780. Volumetría*). El volumen consumido en mililitros de tiosulfato de sodio 0,01 N (SV) multiplicado por 10 y dividido por el peso en gramos de la muestra es el *Índice de peróxidos*.

[NOTA: la titulación del blanco no debe consumir más de 0,1 ml de tiosulfato de sodio 0,01 N (SV)].

Método II

[NOTA: realizar el ensayo protegido de la luz].

Solución de almidón - Agregar 1 g de almidón a una porción de agua fría, mezclar y diluir a 200 ml con agua en ebullición agitando continuamente. Agregar 250 mg de *Ácido Salicílico* y calentar a ebullición durante 3 minutos. Retirar inmediatamente del calor y enfriar.

Procedimiento - Transferir aproximadamente la cantidad de muestra determinada en la *Tabla* a un erlenmeyer con tapón esmerilado, agregar 50 ml de una mezcla de ácido acético glacial y trimetilpentano (3:2), colocar el tapón y agitar hasta disolver. Agregar 0,5 ml de una solución saturada de ioduro de potasio, colocar el tapón, dejar reposar aproximadamente durante 1 minuto, agitar en forma continua y agregar 30 ml de agua. Titular la solución con tiosulfato de sodio 0,01 N (SV), agregado lentamente y con agitación continua y vigorosa, hasta que el color amarillo del iodo desaparezca casi por completo. Agregar aproximadamente 0,5 ml *Solución de almidón* y continuar la titulación agitando constantemente especialmente en las proximidades del punto final de la titulación para liberar todo el iodo de la capa del solvente. Agregar tiosulfato de sodio 0,01 N (SV) hasta que el color azul desaparezca. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias (ver *Titulaciones residuales* en *780. Volumetría*). [NOTA 1: la titulación del blanco no debe consumir más de 0,1 ml de tiosulfato de sodio 0,01 N (SV)]. [NOTA 2: cuando el contenido de peróxidos en la sustancia en ensayo es mayor o igual a 70, existe un retraso de 15 a 30 segundos en la neutralización del indicador de almidón por la tendencia del trimetilpentano a separarse del medio acuoso y el tiempo requerido para mezclar adecuadamente el solvente y la solución valorante y liberar las últimas trazas de iodo; se puede agregar una cantidad de 0,5 a 1,0 % de un emulsionante de elevado balance hidrofilia-lipofilia (BHL), como por ej., polisorbato 60, a la mezcla para retardar la separación de fases y reducir el tiempo que tarda en liberar el iodo. Cuando el contenido de peróxidos en la sustancia en ensayo es mayor a 150 se debe utilizar tiosulfato de sodio 0,1 N (SV)]. Calcular el *Índice de peróxidos* por la fórmula siguiente:

$$1.000VC/P$$

en la cual V es el volumen en ml de tisulfato de sodio (SV) consumido, C es la normalidad de tiosulfato de sodio empleado y P es el peso en g de la sustancia en ensayo.

Tabla.

Índice de peróxidos esperado	Peso de muestra a examinar (g)
0 - 12	2,00 - 5,00
12 - 20	1,20 - 2,00
20 - 30	0,80 - 1,20
30 - 50	0,500 - 0,800
50 - 90	0,300 - 0,500

230. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción, *n*, de una sustancia líquida es el cociente entre el seno del ángulo de incidencia, *i*, de un rayo de luz en el aire, con respecto al seno del ángulo de refracción, *r*, en el líquido y se expresa por:

$$n = \frac{seni}{senr}$$

El índice de refracción es una constante física que se emplea a menudo como criterio de pureza.

Muchas de las especificaciones de índice de refracción en esta Farmacopea se definen a temperaturas distintas de 25 °C a pesar de ser esta la temperatura para las mediciones farmacopeicas. La temperatura debe ajustarse cuidadosamente y mantenerse constante a ± 0,2 °C, ya que el índice de refracción varía significativamente con la temperatura.

Los valores de índice de refracción dados en esta Farmacopea son para la línea D del sodio (doblete a 589,0 y 589,6 nm). La mayoría de los aparatos disponibles están diseñados para ser empleados con luz blanca pero se calibran para dar el índice de refracción en función de la línea D del sodio.

Como no es sencillo medir directamente los ángulos de incidencia y de refracción, se han desarrollado sistemas ópticos especiales que se basan en la medida del ángulo límite de reflexión total.

Un aparato universalmente difundido que opera bajo este principio es el refractómetro de Abbe.

El índice de refracción (comúnmente entre 1,3000 y 1,7000) puede ser leído directamente al tercer decimal y estimado al cuarto decimal.

Para lograr la exactitud teórica de ± 0,0001, es necesario calibrar el aparato contra un estándar provisto por el fabricante, verificar con frecuencia el control de temperatura y la limpieza del aparato determinando el índice de refracción del agua, que corresponde a 1,3330 a 20 °C y 1,3325 a 25 °C.

240. DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE DESTILACIÓN

Para determinar el intervalo de temperaturas dentro del cual un líquido destila o el porcentaje de líquido que destila entre dos temperaturas especificadas, emplear el *Método I* o el *Método II* según se especifique en la monografía correspondiente. El límite inferior del intervalo es la temperatura indicada por el termómetro cuando la primera gota del condensado cae del extremo del refrigerante y el límite superior es el punto seco, es decir, la temperatura a la cual la última gota de líquido se evapora del fondo del matraz de destilación, sin tener en cuenta el líquido que pueda quedar en las paredes del matraz, o la temperatura observada al recolectarse la proporción especificada en la monografía correspondiente.

[NOTA: enfriar todos los líquidos que destilan por debajo de 80 °C, entre 10 y 15 °C antes de medir la muestra a destilar].

Método I

Aparato - Consta de:

Balón de destilación - De vidrio resistente al calor, de 50 a 60 ml, con una longitud total de 10 a 12 cm y un cuello de 14 a 16 mm de diámetro interno. A media distancia del cuello, aproximadamente a 1 2 cm del fondo del balón, posee una salida lateral de 10 a 12 cm de largo y 5 mm de diámetro interno, que forma un ángulo de 70 a 75° con la parte inferior del cuello.

Refrigerante - De vidrio recto, de 55 a 60 cm de longitud con una camisa de enfriamiento de aproximadamente 40 cm de longitud o un refrigerante de otro diseño pero con una capacidad de intercambio equivalente. El extremo inferior del refrigerante puede ser curvo para que actúe como tubo colector o puede conectarse a un adaptador curvo que cumple con el mismo propósito.

Placas aislantes - Dos placas aislantes cuadradas, de 14 a 16 cm de lado, de 5 a 7 mm de espesor, apropiadas para concentrar el calor en la parte inferior del matraz. Cada placa tiene un orificio en su centro y las dos placas difieren sólo en los diámetros de los orificios, que son de 4 y 10 cm, respectivamente. Cuando se emplean, las placas se colocan una sobre la otra en un trípode u otro soporte apropiado, con la placa que tiene el orificio más grande en la parte superior. La perforación de la placa aislante superior, si ésta se emplea, debe ser tal que cuando el balón se fija sobre ella, la porción del balón que queda por debajo de la superficie superior del material aislante tenga una capacidad de 3 a 4 ml.

Receptor - Una probeta de 100 ml graduada en divisiones de 1 ml.

Termómetro - Para evitar la necesidad de corrección por columna emergente, se recomienda un termómetro calibrado, de inmersión parcial con subdivisiones no mayores de 0,2 °C (ver *720. Termómetros*). Cuando se coloca en posición, la columna queda ubicada en el centro del cuello y la parte superior del bulbo está a la altura del borde inferior de la salida lateral.

Fuente de calor - Un mechero de Bunsen, un calentador o un manto eléctrico con una capacidad de ajuste comparable a un mechero de Bunsen.

Procedimiento - Armar el aparato y transferir al balón 25 ml del líquido a destilar, evitando que el líquido penetre por la salida lateral. Insertar el termómetro, proteger el mechero y el balón de corrientes de aire externas y aplicar calor, regulándolo para que transcurran entre 5 y 10 minutos hasta que la primera gota del destilado caiga del refrigerante. Continuar la destilación con un flujo de 4 a 5 ml de destilado por minuto, recolectando el destilado en el receptor. Aplicar la corrección por columna emergente, si fuera necesario y corregir la temperatura observada si la presión barométrica no fuera la normal (760 mm Hg), empleando la fórmula siguiente:

$$t_1 = t_2 + K(760 - b)$$

en la cual t_1 es la temperatura corregida, t_2 es la temperatura observada, b es la presión barométrica, en mm Hg, durante la destilación y K es el factor de corrección indicado en la *Tabla,* a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Método II

Aparato - Emplear un aparato similar al especificado para el *Método I*, excepto que el balón de destilación es de 200 ml, con un cuello de 17 a 19 cm de largo y 20 a 22 mm de diámetro interno.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Método I*, pero colocaren el balón 100 ml del líquido a destilar.

Tabla. Variación del factor de corrección con la temperatura.

Punto de ebullición (°C)	K
<100	0,04
100 a 140	0,045
140 a 190	0,05
190 a 240	0,055
>240	0,06

Actualización parcial

250. DETERMINACION DEL pH

El pH es un índice numérico que se emplea para expresar el grado de acidez o alcalinidad de una solución. La determinación del pH se realiza empleando un medidor del pH, calibrado y capaz de reproducir valores de pH con variaciones menores a 0,02 unidades de pH, empleando un electrodo indicador sensible a la actividad del ión hidrógeno, como el electrodo de vidrio, y un electrodo de referencia apropiado, como por ej., calomel o plata-cloruro de plata. La determinación del pH se realiza mediante la medición de la diferencia de potencial entre el par de electrodos. Las mediciones se hacen a 25 ± 2 °C, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

La escala de pH se define por:

$$pH_x = pH_r + \frac{(E_x - E_r)}{k}$$

en la cual pH_x es el pH de la *Solución muestra*, pH_r es el pH de la *Solución de calibración*, E_x y E_r son los potenciales medidos cuando la celda contiene la *Solución muestra* y la *Solución de calibración*, respectivamente. El valor *k* es el cambio en el potencial por cada unidad de pH y es teóricamente [0,05916 + 0,000198(t – 25 °C)] voltios a la temperatura *t*.

Los valores de pH medidos de esta manera no corresponden exactamente a los obtenidos mediante la definición clásica $pH = -\log a_{H+}$. Cuanto mayor es la similitud entre la composición de la *Solución muestra* y la composición de la *Solución de calibración*, el pH operativo se acerca más al pH teórico.

Conviene destacar que cuando se calibra un medidor del pH empleando una *Solución de calibración* (solución reguladora acuosa) y luego se lo emplea para medir el pH de una solución no acuosa o una suspensión, se modifican la constante de ionización del ácido o la base, la constante dieléctrica del medio, el potencial de contacto de los líquidos de la pila (que puede ocasionar errores de aproximadamente 1 unidad de pH), así como la respuesta a los iones hidrógeno del electrodo empleado. Por estas razones, los valores obtenidos con estas soluciones de carácter parcialmente acuoso, pueden considerarse solamente como valores aparentes de pH.

Soluciones de calibración - Se preparan según se indica en la *Tabla*. Estas soluciones se deben almacenar en envases químicamente resistentes, de cierre perfecto, como por ej., botellas de vidrio Tipo I. Las soluciones deben emplearse dentro de los 3 meses de preparadas. La *Tabla* indica el pH de las soluciones en función de la temperatura. Las indicaciones que se enuncian en esta sección son para la preparación de soluciones que tienen las concentraciones molares (M).

Tetraoxalato de potasio 0,05 M - Disolver 12,61 g de $KH_3(C_2O_4)_2 \cdot 2H_2O$ en agua hasta obtener 1 litro.

Biftalato de potasio 0,05 M - Disolver 10,21 g de $KHC_8H_4O_4$, previamente secado a 110 °C durante 1 hora, en agua hasta obtener 1 litro.

Fosfato equimolar 0,05 M - Disolver 3,53 g de Na_2HPO_4 y 3,39 g de KH_2PO_4, previamente secados a 120 °C durante 2 horas, en agua hasta obtener 1 litro.

Tetraborato de sodio 0,01 M - Disolver 3,80 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ en agua hasta obtener 1 litro. Proteger de la absorción de dióxido de carbono.

Hidróxido de calcio saturado a 25 °C - Agitar un exceso de hidróxido de calcio con agua y decantar a 25 °C antes de emplear. Proteger de la absorción de dióxido de carbono.

Debido a las variaciones en la naturaleza y operación de los medidores del pH disponibles, no es práctico dar instrucciones universalmente aplicables para las determinaciones potenciométricas del pH. Los principios generales dados a continuación sé deben ajustar a las indicaciones provistas para cada aparato por su fabricante. Antes de su empleo, examinar los electrodos y verificar si está presente el puente salino.

Para calibrar el medidor del pH seleccionar dos *Soluciones de calibración* cuya diferencia de pH no exceda 4 unidades, de manera tal que el pH a determinar esté comprendido entre ambos valores. Llenar un recipiente con una de las *Soluciones de calibración* a la temperatura a la cual se medirá la *Solución muestra*. Fijar el control de temperatura a la temperatura de la solución a medir y ajustar el control de calibración de manera que el valor del pH observado sea idéntico al tabulado. Lavar los electrodos y el recipiente con varias porciones de la segunda *Solución de calibración*, llenar el recipiente con esa solución a la misma temperatura que se debe medir la *Solución muestra*. El pH de la segunda *Solución de calibración* debe estar dentro de ± 0,07 unidades de pH del valor tabulado. Si se observa una desviación mayor, examinar los

electrodos y reemplazarlos si presentan defectos. Ajustar la pendiente o control de temperatura de manera que el valor de pH observado sea idéntico al tabulado. Repetir la calibración hasta que ambas *Soluciones de calibración* den valores de pH dentro de las 0,02 unidades del valor tabulado, sin ajuste adicional de los controles. Cuando el sistema esté funcionando en forma apropiada, lavar los electrodos y el recipiente varias veces con la *Solución muestra*. Posteriormente, llenar el recipiente con esta solución y efectuar la medición del pH. Emplear agua para solubilizar o diluir la muestra para las determinaciones del pH.

Cuando sea suficiente un valor aproximado de pH, se pueden emplear indicadores y/o papeles indicadores (ver *Indicadores, Papeles y Papeles indicadores*).

Tabla. Valores de pH de las soluciones para calibración.

Temperatura (°C)	Tetraoxalato de potasio 0,05 M	Biftalato de potasio 0,05 M	Fosfato equimolar 0,05 M	Tetraborato de sodio 0,01 M	Hidróxido de calcio, saturado a 25 °C
10	1,67	4,00	6,92	9,33	13,00
15	1,67	4,00	6,90	9,28	12,81
20	1,68	4,00	6,88	9,23	12,63
25	1,68	4,01	6,86	9,18	12,45
30	1,68	4,02	6,85	9,14	12,29
35	1,69	4,02	6,84	9,10	12,13
40	1,69	4,04	6,84	9,07	11,98
45	1,70	4,05	6,83	9,04	11,84
50	1,71	4,06	6,83	9,01	11,71
55	1,72	4,08	6,83	8,99	11,57
60	1,72	4,09	6,84	8,96	11,45

[1] Se pueden emplear *Soluciones de calibración* de medidores del pH disponibles comercialmente, estandarizadas por métodos reconocidos, rotuladas con un valor de pH exacto a 0,01 unidad de pH y que estén acompañadas de una tabla con los valores de pH a distintas temperaturas.

260. DETERMINACIÓN DEL PUNTO DE FUSIÓN

Los puntos o intervalos de fusión que figuran en esta Farmacopea se definen como las temperaturas o intervalos de temperaturas dentro de las cuales se observa la aglomeración y luego la fusión completa de los sólidos cuando se procede según los métodos indicados a continuación.

Método I

Para muestras que se reducen fácilmente a polvo.

Aparato - Consta de un tubo de vidrio de fondo semiesférico de 30 a 40 mm de diámetro interno y de 12 cm de longitud, el espesor de las paredes no es mayor a 1,5 mm y el vidrio debe ser apto para exponerse directamente a la llama del mechero de Bunsen. Para homogeneizar la temperatura a este recipiente, se le adapta un agitador construido con una varilla de vidrio de 2 mm de diámetro externo. Ambos termómetros, el principal que abarca la escala deseada de temperatura y el auxiliar para corrección de la columna, deben responder a las consideraciones generales (ver *720. Termómetros*). Consta, además, de un tubo capilar de vidrio, cerrado en uno de sus extremos, de aproximadamente 9 cm de longitud y de 0,8 a 1,2 mm de diámetro interno, cuyas paredes tienen un espesor de 0,2 a 0,3 mm.

Procedimiento - Reducir la muestra a polvo fino y secarla en un desecador al vacío sobre un desecante apropiado durante 24 horas o en las condiciones especificadas en la monografía correspondiente.

Elegir un baño apropiado para la temperatura de fusión que va a determinarse y llenar el recipiente destinado al baño de calefacción hasta un nivel que permita sumergir el termómetro, de modo que la porción superior del bulbo quede 2 a 3 cm debajo de la superficie del baño y el extremo inferior a una distancia aproximadamente igual del fondo del recipiente.

Cargar el tubo capilar seco con suficiente cantidad de polvo hasta formar una columna de 2,5 a 3,5 mm de altura, luego de haberlo comprimido golpeándolo moderadamente sobre una superficie sólida. Unir el tubo capilar al termómetro, ambos humedecidos con el líquido del baño. Ajustar su altura, de modo que la muestra contenida en el capilar quede junto al bulbo del termómetro.

Adaptar el termómetro auxiliar de modo que el centro del bulbo quede lo más cercano posible al vástago del termómetro principal en un punto equidistante de la superficie del baño y de la división correspondiente al punto de fusión esperado.

Calentar el baño con la llama del mechero hasta alcanzar una temperatura de 30 °C debajo del punto de fusión esperado. Introducir el termómetro con el capilar adherido y continuar el calentamiento de manera tal que la temperatura se eleve a una velocidad de unos 3 °C por minuto, hasta alcanzar una temperatura de 3 °C por debajo del punto de fusión esperado. A partir de ese instante, se debe elevar la temperatura a razón de 1 °C por minuto aproximadamente, hasta que finalice la fusión. La temperatura a la cual se observa que la columna de la muestra comienza a contraerse de manera franca contra las paredes del tubo, en un punto cualquiera, se define como el comienzo de la fusión; y la temperatura a la cual la sustancia se vuelve completamente líquida, se define como término de la fusión. Agitar continuamente el baño durante el calentamiento.

Para establecer exactamente el resultado obtenido como intervalo de fusión conviene repetir la determinación. Para ello, dejar enfriar el baño hasta 10 °C por debajo del punto de fusión o hasta una temperatura más baja y repetir el método descrito empleando nuevos tubos capilares y nuevas porciones de muestra. Anotar la temperatura registrada por el termómetro auxiliar al terminar la fusión de la muestra, si fuera necesario, aplicar la corrección por columna emergente (ver *720. Termómetros*) empleando la fórmula siguiente:

$$t_c = 0{,}00016 \times N(T - t)$$

en la cual t_c, representa la corrección que debe agregarse al punto de fusión observado, N el número de grados de la columna del termómetro principal emergente del baño, T la temperatura al terminar la fusión y t la temperatura registrada por el termómetro auxiliar. La corrección se agrega a la lectura del termómetro principal.

Cuando se trata de muestras que funden a temperatura elevada, la determinación es más exacta si el capilar no se introduce en el baño de calefacción hasta que éste se encuentre a una temperatura de 10 °C por debajo del punto de fusión esperado. Esto es necesario cuando la sustancia pueda descomponerse al calentarla largo tiempo.

Los líquidos empleados como baños de calefacción apropiados son la vaselina líquida o

un aceite de silicona, debiéndose considerar para su elección la temperatura a determinar.

Método II

Este método se emplea para muestras que no se reducen fácilmente a polvo.

Procedimiento - Fundir cuidadosamente la muestra a la temperatura más baja posible e introducir el material fundido en un capilar abierto en ambos extremos, hasta formar una columna de unos 10 mm de altura. Enfriar el capilar cargado a una temperatura menor o igual a 10 °C durante aproximadamente 24 horas o a 0 °C durante al menos 2 horas. Unir el capilar al termómetro y cuidar que la muestra en el capilar quede junto al bulbo del termómetro. Introducir en un baño de agua y calentar, según se indica en el *Método I*, excepto que al llegar la temperatura a aproximadamente 5 °C debajo del punto de fusión esperado, se aumenta la temperatura a razón de medio grado por minuto. Se toma como punto de fusión la temperatura a la cual la muestra comienza a ascender dentro del tubo capilar.

Método III

Este método se emplea para el ensayo de vaselina.

Procedimiento - Fundir la muestra, agitando hasta alcanzar una temperatura de 90 a 92 °C y luego dejar enfriar la sustancia fundida hasta una temperatura de 8 a 10 °C sobre el punto de fusión calculado. Enfriar hasta 5 °C el bulbo de un termómetro, secar y, mientras esté aún frío, sumergirlo en la muestra fundida hasta la mitad del bulbo aproximadamente. Retirar inmediatamente y sostener en posición vertical, hasta que la superficie de la muestra depositada sobre el bulbo solidifique, introducir aproximadamente 5 minutos en un baño de agua a una temperatura que no exceda los 16 °C.

Adaptar el termómetro dentro de un tubo de ensayo, por medio de un corcho, de modo que su extremo inferior quede 15 mm por encima del fondo del tubo de ensayo. Suspender el tubo de ensayo en un baño de agua a una temperatura de 16 °C y elevar la temperatura del baño hasta 30 °C, a razón de 2 °C por minuto y luego a razón de 1 °C por minuto, hasta que la primera gota se desprenda del termómetro. La temperatura a la cual esto sucede representa el punto de fusión. Para cada determinación emplear una porción recién fundida de la muestra. Si la variación de tres determinaciones es menor de 1 °C, tomar el promedio. Si la variación es mayor de 1 °C realizar dos determinaciones más y promediar las cinco.

Actualización total

270. DETERMINACIÓN DEL RESIDUO DE IGNICIÓN <PWG>

Pesar exactamente entre 1 y 2 g de muestra o la cantidad especificada en la monografía correspondiente en un crisol apropiado, previamente sometido a ignición, enfriado y pesado.

Calentar con un mechero, suavemente al principio y luego con mayor intensidad, hasta que la muestra se carbonice totalmente, evitando proyecciones y enfriar. Humedecer el residuo con 1 ml de ácido sulfúrico, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Calentar suavemente hasta que no se desprendan más vapores blancos y someter a ignición a 600 ± 50 °C a menos que se especifique otra temperatura en la monografía correspondiente, hasta que el residuo carbonoso se consuma. Enfriar en un desecador, pesar y calcular el porcentaje del residuo. Si la cantidad de residuo obtenido es mayor al límite especificado en la monografía correspondiente, humedecer nuevamente el residuo con 1 ml de ácido sulfúrico, calentar y someter a ignición como se indicó anteriormente y nuevamente calcular el porcentaje del residuo. Continuar la ignición hasta peso constante, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Realizar la ignición bajo una campana extractora bien ventilada, pero protegida de las corrientes de aire y a la menor temperatura necesaria para lograr la combustión completa del residuo carbonoso. Puede emplearse una mufla, si se desea, y su uso se recomienda para la ignición final a 600 ± 50 °C.

Comprobar la exactitud de la medición y el sistema de circuitos de la mufla mediante el control de la temperatura en diferentes puntos del horno. Colocar la muestra en la posición más apropiada de acuerdo con las condiciones del método a aplicar. La variación de temperatura tolerada es de ± 25 °C para cada punto evaluado.

La calibración de la mufla debe llevarse a cabo mediante el empleo de un medidor de temperatura digital y una termocupla validada.

280. DISOLUCION COMPLETA

Colocar la cantidad de sustancia especificada en la monografía correspondiente en una probeta de vidrio de 10 ml, con tapa, perfectamente limpia.

Empleando el solvente especificado en la monografía correspondiente o en el rótulo del producto, llenar la probeta. Agitar suavemente para favorecer la disolución: la solución no debe ser menos transparente que un volumen igual del mismo solvente contenido en una probeta similar examinada de la misma manera.

290. DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA EN POLVOS

El tamizado es el método generalmente empleado para determinar la granulometría de los polvos de uso farmacéutico. E s particularmente útil cuando la mayoría de las partículas son mayores de 100 µm.

Los tamices se fabrican preferentemente de acero inoxidable, bronce u otro material inerte. Constan de una malla de alambre tejido, con hilos simples y de aberturas cuadradas o casi cuadradas, la cual se fija a la base de un cilindro abierto.

La granulometría de los polvos se caracteriza en términos descriptivos, según la abertura nominal del tamiz por donde pasa dicho polvo. De esta manera se reconocen los siguientes tipos de polvos:

Polvo grueso - No menos de 100 % pasa a través de un tamiz N° 1,7 y no más de 40 % pasa a través de un tamiz N° 355.

Polvo moderadamente grueso - No menos de 100 % pasa a través de un tamiz N° 710 y no más de 40 % pasa a través de un tamiz N° 250.

Polvo moderadamente fino - No menos de 95 % pasa a través de un tamiz N° 355 y no más de 40 % pasa a través de un tamiz N° 180.

Polvo fino - No menos de 95 % pasa a través de un tamiz N° 180 y no más de 40 % pasa a través de un tamiz N° 125.

Polvo muy fino - No menos de 95 % pasa a través de un tamiz N° 125 y no más de 40 % pasa a través de un tamiz N° 90.

Las denominaciones empleadas para los tamices se detallan en la *Tabla* junto con la abertura nominal de cada uno. Como regla general en esta Farmacopea se emplea la denominación recomendada por la norma ISO 3310-1990.

Método de tamizado

El método analítico consiste en colocar los tamices, indicados en la *Tabla*, uno sobre otro en orden creciente de abertura y luego transferir la muestra al tamiz superior. El conjunto de tamices se agita mediante un dispositivo mecánico que pueda impartir a los tamices ya sea un movimiento rotatorio con golpes de asentamiento (de 200 a 300 revoluciones horizontales y con 150 a 200 golpes de asentamiento por minuto) o un movimiento vibratorio (1 a 2 mm de amplitud), a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Luego se determina el peso del material retenido en cada tamiz. L os resultados se expresan en porcentaje de peso de polvo en cada uno de los intervalos determinados por el tamaño de abertura de los tamices.

Polvos gruesos y moderadamente gruesos: colocar de 25 a 100 g de muestra sobre un tamiz, normatizado. Agitar durante no menos de 20 minutos o hasta completar el pasaje del polvo. Determinar el peso de la muestra que atravesó la malla y el peso de la muestra remanente en el tamiz.

Polvos moderadamente finos, finos o muy finos: proceder según se indica en *Polvos gruesos y moderadamente gruesos* empleando cantidades que no excedan los 25 g y agitando no menos de 30 minutos.

Para los polvos que tiendan a obturar las aberturas del tamiz cepillar cuidadosamente las mismas periódicamente durante el ensayo.

Tabla. Denominaciones y tamaño de abertura de tamices

Denominaciones		Tamaño nominal
ISO 3310(1990)	ASTM E11-70	de la abertura
2	10	2,00 mm
1,7	12	1,70 mm
1,4	14	1,40 mm
850	20	850 µm
710	25	710 µm
500	35	500 µm
425	40	425 µm
355	45	355 µm
300	50	300 µm
250	60	250 µm
212	70	212 µm

180	80	180 µm
150	100	150 µm
125	120	125 µm
90	170	90 µm
75	200	75 µm
45	325	45 µm

*ASTM E 11 US: American Society for Testing and Materials Specification E 11 U.S. Standard Sieve Series.

300. ELECTROFORESIS

Las partículas cargadas, disueltas o dispersas en una solución electrolítica migran hacia el electrodo de polaridad opuesta, bajo la acción de un campo eléctrico.

En la electroforesis en gel, el desplazamiento de las partículas se retarda por las interacciones con la matriz de gel que constituye el medio de migración y se comporta como un tamiz molecular. Las interacciones entre las fuerzas eléctricas y la tamización molecular dan lugar a una velocidad de migración diferencial según el tamaño, la forma y la carga de las partículas. Las diferentes macromoléculas presentes en una mezcla migran a diferentes velocidades durante el proceso electroforético, debido a sus propiedades fisicoquímicas, separándose en fracciones concretas.

Las separaciones electroforéticas se pueden realizar sin soporte, como por ej., en la electroforesis capilar en solución libre o en medios estabilizantes como placas de capa delgada, películas y geles.

ELECTROFORESIS DE LIBRE MIGRACIÓN O FRONTAL

Este método se emplea fundamentalmente para determinar movilidades electroforéticas experimentalmente y se caracteriza por brindar medidas directas y reproducibles. Se aplica principalmente a sustancias de alto peso molecular y poco difundibles. Las bandas se localizan en principio mediante un método físico como refractometría o conductimetría. Luego de la aplicación de un campo eléctrico definido durante un tiempo exactamente medido, se observa la ubicación de las nuevas bandas obtenidas. Las condiciones operativas deben ser tales que permitan obtener tantas bandas como componentes haya en la muestra.

ELECTROFORESIS SOBRE UN SOPORTE O ELECTROFORESIS DE ZONA

Este método requiere el empleo de cantidades de muestra reducidas.

Existen diferentes tipos de soportes, como papel, gel de agar, acetato de celulosa, almidón, agarosa, metacrilamida y gel mixto. La naturaleza del soporte introduce numerosos factores que modifican la movilidad:

a) debido a las sinuosidades de los canalículos del soporte, la distancia recorrida aparentemente es menor que la real;

b) algunos soportes no son eléctricamente neutros; esto provoca, en muchas ocasiones, un flujo electroendosmótico importante;

c) efectos de calentamiento debidos al efecto joule pueden provocar evaporación del solvente desde el soporte y por capilaridad, ocurriendo un movimiento de la solución desde los extremos hacia el centro. Por lo tanto, la fuerza iónica, tiende a aumentar progresivamente.

La velocidad de migración depende fundamentalmente de cuatro factores: movilidad de la partícula cargada, flujo electroendosmótico, flujo de evaporación y campo eléctrico. Por lo tanto, es necesario trabajar en condiciones experimentales claramente definidas y emplear, siempre que sea posible, *Sustancias de referencia*.

Aparato - Consta de:

- *Generador de corriente contínua*, cuyo voltaje se pueda controlar y estabilizar.
- *Cubeta electroforética*. Generalmente son rectangulares, de vidrio o plástico rígido, con dos compartimentos separados, el anódico y el catódico, que contienen la solución de electrolito. En cada compartimento se introduce un electrodo de, por ej., platino o grafito; los cuales se conectan por medio de un circuito convenientemente aislado a los correspondientes terminales del *Generador de corriente contínua* para constituir el ánodo y el cátodo. El nivel de líquido en ambos compartimentos se debe mantener igualado para prevenir efecto sifón.

La cubeta electroforética se cierra herméticamente para mantener un ambiente saturado de humedad durante todo el proceso y reducir la evaporación de solvente. Se puede emplear un dispositivo de seguridad que corte el paso de corriente eléctrica cuando se levanta la tapa. Si la potencia eléctrica que pasa a través del soporte excede los 10 W, es recomendable refrigerar el soporte.

- *Dispositivo portasoportes*:

Para electroforesis en tiras. La tira soporte, previamente humedecida con la solución conductora y con los extremos sumergidos en los correspondientes compartimentos electródicos, se fija y se tensa sobre un portasoporte apropiado, diseñado para prevenir la difusión del electrolito conductor de la corriente eléctrica, como un bastidor horizontal, un caballete en V invertida o una superficie uniforme con puntos de contacto a intervalos apropiados.

Para electroforesis en gel. El dispositivo consta esencialmente de una placa de vidrio (por ej., un portaobjetos de microscopio) sobre la que se deposita, en la totalidad de su superficie, una capa firmemente adherida de gel de espesor uniforme. La conexión entre el gel y la solución conductora se realiza de varios modos, dependiendo del tipo de aparato empleado. Se deben tomar precauciones para evitar la condensación de humedad o el desecado de la capa sólida.

- *Dispositivo de medida o medio de detección*.

Procedimiento - Transferir la solución del electrolito a los compartimentos electródicos. Colocar el soporte apropiadamente impregnado con el electrolito en la cubeta según las condiciones indicadas para el tipo de aparato empleado. Localizar la zona de aplicación y aplicar la muestra. Aplicar la corriente eléctrica durante el tiempo especificado. Luego de desconectar la corriente, retirar el soporte de la cubeta electroforética, secar y revelar.

ELECTROFORESIS SOBRE GEL CILÍNDRICO DE POLIACRILAMIDA

En la electroforesis sobre gel cilíndrico de poliacrilamida, la fase estacionaria está constituida por un gel preparado con una mezcla de acrilamida y N, N'-metilenobisacrilamida; los geles se preparan en tubos, generalmente de 0,5 cm de diámetro interno y 7,5 cm de longitud; en cada tubo se aplica una sola muestra.

Aparato - Consta de dos compartimentos destinados a las soluciones reguladoras, fabricados con un material apropiado como polimetacrilato de metilo, dispuestos en posición vertical uno arriba del otro. Cada compartimento está provisto de un electrodo de platino que se conecta con un generador de corriente continua que permite trabajar a intensidad constante o voltaje constante. Para los geles cilíndricos, el compartimento superior está provisto en su base de varios dispositivos para los tubos situados equidistantes al electrodo.

Procedimiento - [NOTA: se recomienda desgasificar las soluciones antes de la polimerización y emplear el gel inmediatamente después de su preparación]. Preparar la mezcla de geles según se especifica en la monografía correspondiente. Verter la mezcla de gel en tubos apropiados, tapados en la parte inferior, igualar el nivel de gel en cada uno de los tubos y rellenar hasta 1 cm del borde superior. Evitar que queden burbujas de aire atrapadas en el interior de los tubos. Cubrir la mezcla de gel con una capa de agua para evitar el contacto con el aire y dejar reposar para que ocurra la gelificación. Por lo general, la formación del gel requiere aproximadamente 30 minutos y se completa cuando se produce una interfase nítida entre el gel y la capa de agua. Eliminar la capa de agua, rellenar el compartimento inferior con la solución reguladora indicada en la monografía correspondiente y destapar los tubos. Introducir los tubos en los dispositivos del compartimento superior y ajustarlos de modo que la parte inferior de los tubos se encuentre inmersa en la solución reguladora del compartimento inferior. Rellenar los tubos cuidadosamente con la solución reguladora especificada. Preparar la solución muestra y la solución de referencia con el identificador especificado y aumentar la densidad de estas soluciones mediante el agregado de sacarosa. Aplicar ambas soluciones en la superficie del gel, empleando un tubo diferente para cada solución. Agregar la misma solución reguladora en el compartimento superior. Conectar los electrodos al generador de corriente y desarrollar la electroforesis a la temperatura y el voltaje o intensidad de corriente constantes especificados en la monografía correspondiente.

ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO DE SODIO (SDS-PAGE)

La electroforesis en gel de poliacrilamida se emplea con fines de caracterización cualitativa de proteínas en preparaciones biológicas, control de pureza y determinaciones cuantitativas.

La electroforesis analítica en gel es un método apropiado para identificar y controlar la homogeneidad de las proteínas en productos farmacéuticos. También se emplea para estimar los pesos moleculares de subunidades proteicas y para determinar las subunidades que componen las proteínas purificadas.

Características de los geles de poliacrilamida

Las propiedades de tamización de los geles de poliacrilamida se deben a su particular estructura, una red tridimensional de fibras y poros obtenida mediante enlaces cruzados de unidades de bisacrilamida bifuncionales con cadenas adyacentes de poliacrilamida. La polimerización se cataliza a través de un generador de radicales libres constituido por persulfato de amonio y tetrametiletilendiamina.

Si se aumenta la concentración de acrilamida del gel, disminuye su tamaño de poro efectivo. Este se define, desde el punto de vista operativo, por sus propiedades de tamización molecular; es decir, la resistencia con la que se opone a la migración de

macromoléculas. Las concentraciones de acrilamida que se pueden emplear se encuentran dentro de ciertos límites ya que a altas concentraciones los geles se rompen con mayor facilidad y su manejo es más dificultoso.

Cuando el tamaño de poro disminuye, la velocidad de migración de la molécula a través del gel decrece. La resolución para un p roducto determinado se puede optimizar ajustando el tamaño de poro del gel o modificando la concentración de acrilamida. Por lo tanto, las características físicas de un gel determinado dependen de su contenido de acrilamida y de bisacrilamida.

Además de la composición del gel, el estado de la molécula constituye un factor importante que afecta la movilidad electroforética. Para las proteínas, la movilidad electroforética depende del pK de los grupos cargados y del tamaño de la molécula; siendo afectada también por la naturaleza, concentración y pH de la solución reguladora, la temperatura, la intensidad del campo eléctrico aplicado y la naturaleza del material del soporte.

Electroforésis en gel de poliacrilamida con desnaturalización

Este método se emplea para el análisis de monómeros polipeptídicos de peso molecular comprendido entre 14.000 y 100.000.

La electroforesis en gel de poliacrilamida con desnaturalización, empleando dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), es la técnica electroforética más empleada para la evaluación de la calidad de productos proteicos. De modo general, la electroforesis analítica de proteínas se realiza en geles de poliacrilamida en condiciones en las que se asegure la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales, limitándose los procesos de agregación. Se emplea frecuentemente para disociar las proteínas antes de la aplicación en el gel, el dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico fuerte, en combinación con calor. Los polipéptidos desnaturalizados se unen al SDS, adquieren carga negativa y presentan una relación carga/masa constante, independientemente del tipo de proteína considerada. La cantidad de SDS es casi siempre proporcional al peso molecular del polipéptido y es independiente de su secuencia ya que los complejos SDS-polipéptido migran a través de los geles de poliacrilamida con movilidades que dependen del tamaño del polipéptido.

Las movilidades electroforéticas de los complejos SDS-polipéptido resultantes presentan siempre la misma relación funcional con los pesos moleculares. La migración de los complejos SDS-polipéptido se efectúa hacia el ánodo, a u na velocidad superior para los complejos de peso molecular más bajo que para aquéllos con peso molecular alto. De este modo, es posible estimar el peso molecular de una proteína a partir de su movilidad relativa en un método SDS-PAGE calibrado, siendo la presencia de una única banda en dicho gel un criterio de pureza.

Las eventuales modificaciones del esqueleto polipéptidico, como por ej., una *O*- o *N*-glicosilación, tiene un impacto significativo sobre el peso molecular aparente de la proteína ya que el SDS no se une del mismo modo a los grupos glucídicos que a los grupos polipéptidicos, por lo que en este caso no se mantiene constante la relación carga/masa.

Condiciones reductoras - La asociación de las subunidades polipéptidicas y la estructura tridimensional de las proteínas se mantiene fundamentalmente por la existencia de enlaces disulfuro. Uno de los objetivos de la separación SDS-PAGE en condiciones reductoras es la ruptura de esta estructura por reducción de los enlaces disulfuro. La desnaturalización y disociación completa de las proteínas por tratamiento con 2-mercaptoetanol o ditiotreitol (DTT) da lugar a un desdoblamiento de la cadena polipéptidica, seguido de la formación de un complejo con el SDS. En estas condiciones, el peso molecular de las subunidades polipéptidicas se puede calcular por regresión lineal en presencia de patrones con pesos moleculares apropiados.

Condiciones no r eductoras - Para algunos análisis no es aconsejable la disociación completa de la proteína en subunidades peptídicas. Si no se emplean agentes reductores como el 2-mercaptoetanol o DTT, los enlaces covalentes disulfuro permanecen intactos manteniéndose la forma oligomérica de la proteína. Los complejos SDS-proteína oligomérica migran más lentamente que sus subunidades SDS-polipéptido. Además, las proteínas no reducidas no se pueden saturar completamente con SDS y por lo tanto, no pueden unirse al detergente en una proporción de masa constante. Esto hace que la determinación del peso molecular de estas moléculas por SDS-PAGE sea más difícil que los análisis de los polipéptidos totalmente desnaturalizados, ya que es necesario que tanto las proteínas patrón como las proteínas de la muestra presenten configuraciones similares para que se puedan comparar. Sin embargo, la obtención en el gel de una sola banda coloreada es un criterio de pureza.

CARACTERíSTICAS DE LA ELECTROFORESIS EN GEL CON SISTEMA REGULADOR DISCONTINUO

El método electroforético más usado para la caracterización de mezclas complejas de proteínas se basa en el empleo de un sistema regulador discontinuo consistente en dos geles contiguos pero distintos: un gel inferior, llamado gel de separación o de resolución, y otro superior, gel de apilamiento. Estos dos geles presentan porosidad, pH y fuerzas iónicas diferentes. Además se emplean iones con diferentes movilidades iónicas en el gel y en la solución reguladora. La discontinuidad del sistema provoca una concentración de las muestras de mayor tamaño en el gel de apilamiento y por lo tanto se mejora la resolución. Cuando se aplica la corriente eléctrica, se desarrolla un gradiente de potencial negativo a través de la solución muestra que conduce a las proteínas hacia el gel de apilamiento. Los iones glicinato contenidos en la solución reguladora empujan a las proteínas hacia el gel de apilamiento. Se forma rápidamente una zona de frente móvil cuya cabecera está constituida por iones cloruro de alta movilidad, seguidos de iones glicinato más lentos en la cola. Se produce un gradiente de alto voltaje localizado entre los frentes iónicos de cabeza y cola, provocando que los complejos SDS-proteína se concentren en una zona muy estrecha (apilamiento) y migren entre las fases de cloruro y glicinato. Independientemente del volumen de muestra aplicado, el conjunto de complejos SDS-proteína se condensa en una región muy estrecha y penetran en el gel de separación en forma de banda estrecha, bien definida y de alta densidad proteica. El gel de apilamiento, de tamaño de poro, grande, no retarda la migración de la mayoría de las proteínas y actúa principalmente como medio anticonvectivo. En la interfase de ambos geles, las proteínas experimentan un incremento brusco de retardo electroforético debido al menor tamaño de poro del gel de resolución. Una vez que se encuentran en este gel, las proteínas continúan avanzando lentamente por el efecto de tamización molecular que ejerce la matriz. Los iones glicinato migran por delante de las proteínas, por lo que éstas se mueven en un medio de pH uniforme formado por el tris(hidroximetil)amino-metano y la glicina. La tamización molecular hace que la separación de los complejos SDS-polipéptido se base en sus correspondientes pesos moleculares.

PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA SDS VERTICALES CON SISTEMA REGULADOR DISCONTINUO

Preparación de los geles

En un gel de poliacrilamida con sistema regulador discontinuo, se recomienda verter el gel de resolución, dejar polimerizar y a continuación verter el gel de apilamiento ya que la constitución de los dos geles de archilamida-bisacrilamida es diferente.

Preparación del gel de resolución - En un erlenmeyer, preparar el volumen apropiado de la solución de acrilamida que contenga la concentración deseada para el gel de resolución, empleando los valores indicados en la *Tabla 1*. Mezclar los componentes en el orden indicado. Antes del agregado de la solución de persulfato de amonio y del tetrametiletilendiamina (TEMED), filtrar la solución, si fuera necesario, empleando vacío, a través de una membrana de acetato de celulosa (de 0,45 mm de diámetro); mantener la solución bajo vacío por rotación de la unidad de filtración hasta que no se formen más burbujas. Agregar las cantidades apropiadas de solución de persulfato de amonio y de TEMED indicadas en la *Tabla 1*, agitar y verter rápidamente en el espacio de separación entre las dos placas de vidrio del molde. Dejar espacio suficiente para el gel de apilamiento (la longitud de un diente del peine más 1 cm). Empleando una pipeta de vidrio de punta larga, recubrir la solución con isobutanol saturado con agua. Dejar el gel en posición vertical a temperatura ambiente para que se produzca la polimerización.

Preparación del gel de apilamiento – Luego de la polimerización completa del gel de resolución (aproximadamente 30 minutos), retirar la capa superior de isobutanol y lavar varias veces con agua la parte superior del gel para eliminar la capa de isobutanol y la posible acrilamida no polimerizada. Eliminar la mayor cantidad posible de líquido de la superficie del gel eliminando el resto de agua con la ayuda de un papel de filtro.

En un erlenmeyer, preparar un volumen apropiado de solución que contenga la concentración requerida para el gel de resolución, según se indica en la *Tabla 2*. Mezclar los componentes en el orden indicado. Antes del agregado de la solución de persulfato de amonio y del tetrametiletilendiamina, filtrar la solución, si fuera necesario, empleando vacío, a través de una membrana de acetato de celulosa (de 0,45 mm de diámetro); mantener la solución bajo vacío por rotación de la unidad de filtración hasta que no se formen más burbujas. Agregar las cantidades apropiadas de solución de persulfato de amonio y de TEMED, indicadas en la *Tabla 2*, agitar y verter rápidamente en el espacio de separación entre las dos placas de vidrio del molde, directamente sobre la superficie del gel de resolución polimerizado. De

inmediato, insertar un peine limpio de politetrafluoroetileno en la solución del gel de apilamiento, evitando la formación de burbujas de aire. Agregar más solución del gel de apilamiento hasta rellenar completamente los espacios del peine. Colocar el gel en posición vertical y dejar polimerizar a temperatura ambiente.

Montaje del gel en el equipo de electroforesis y separación electroforética

Solución reguladora de desarrollo SDS-PAGE - Disolver en agua 151,4 g de tris(hidroximetil)aminoetano, 721,0 g de glicina y 50,0 g de lauril sulfato de sodio, y completar a 5 litros con agua. Inmediatamente antes del uso, diluir 10 veces su volumen con agua y mezclar. El pH de esta solución debe estar comprendido entre 8,1 y 8,8.

Procedimiento - Una vez completada la polimerización (aproximadamente 30 minutos), retirar cuidadosamente el peine de politetrafluoroetileno y lavar los pocitos, de inmediato, con agua o *Solución reguladora de desarrollo SDS-PAGE* para eliminar la posible acrilainida no polimerizada. Recortar los dientes del gel de apilamiento, si fuera necesario, con una aguja hipodérmica roma fijada a u na jeringa. Quitar las pinzas de uno de los lados cortos, retirar el tubo con precaución y volver a colocarlas. Proceder del mismo modo en el otro. Retirar el tubo de la parte inferior del gel, montar el gel en el aparato de electroforesis y agregar las soluciones reguladoras en los compartimentos superior e inferior. Eliminar las burbujas que se formen en la parte inferior del gel, entre las dos placas de vidrio; preferiblemente efectuar este procedimiento con una aguja hipodérmica doblada fijada a una jeringa. [NOTA: nunca realizar un predesarrollo sin muestras ya que se destruye la discontinuidad de los sistemas reguladores]. Antes de aplicar las muestras, lavar cuidadosamente la ranura con *Solución reguladora de desarrollo SDS-PAGE*. Preparar la solución muestra y la solución de referencia en el medio recomendado y proceder según se especifica en la monografía correspondiente. Aplicar el volumen apropiado de cada solución en los pocitos del gel de apilamiento y desarrollar la electroforesis. En ocasiones resulta necesario modificar el tiempo y la relación intensidad/voltaje, para obtener una separación óptima. Comprobar que el frente del indicador se desplace en el gel de resolución. Cuando el indicador alcance la parte inferior del gel, detener la electroforesis. Retirar el montaje del gel del aparato y separar las placas de vidrio. Retirar los espaciadores, cortar y tirar el gel de apilamiento y proceder inmediatamente a la tinción.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES

Todas las etapas de tinción de geles se realizan a temperatura ambiente con agitación suave (por ej., en una placa de movimiento giratorio) en un recipiente apropiado.

Tinción con Coomassie - Es el método de tinción de proteínas más empleado, con un nivel de detección del orden de 1 a 10 µg de proteína por banda.

Solución colorante de Coomassie - Disolver 1,25 g de Azul brillante de Coomassie R-250 en 1 litro de una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (5:4:1).

Solución de decoloración - Emplear una mezcla de agua, metanol y ácido acético glacial (5:4:1).

Procedimiento - Sumergir el gel en un exceso de *Solución colorante de Coomassie* y dejar en contacto por lo menos durante 1 hora. Eliminar la *Solución colorante de Coomassie*. Decolorar el gel con un e xceso de *Solución de decoloración*. Cambiar la *Solución de decoloración* varias veces hasta que las bandas de proteínas teñidas se distingan nítidamente sobre un fondo claro. Cuanto más se lave, menor será la cantidad de proteína que se pueda detectar. La decoloración se puede acelerar agregando en la *Solución de decoloración* algunos gramos de resina de intercambio aniónico.

[NOTA: las soluciones ácido-alcohólicas empleadas en este procedimiento no fijan por completo las proteínas en el gel. Esto puede conducir a la pérdida de algunas proteínas de bajo peso molecular durante el proceso de tinción y decoloración de geles finos. La fijación permanente se obtiene introduciendo el gel en una mezcla de agua, metanol y ácido tricloroacético (5:4:1) durante 1 hora antes de introducirlo en la *Solución colorante de Coomassie*.]

Tinción con plata - Es el método más sensible para proteínas teñidas en geles y permite detectar bandas que contengan 10 a 100 ng de proteína.

Reactivo de nitrato de plata - A una mezcla de 3 ml de amoníaco concentrado y 40 ml de hidróxido de sodio 1 M, agregar 8 ml de una solución al 20 % de nitrato de plata, gota a gota, y con agitación. Diluir con agua a 200 ml.

Solución de fijación. - A 250 ml de metanol, agregar 0,27 ml de solución de formaldehído al 35 % y diluir con agua a 500 ml.

Solución de desarrollo - Diluir 2,5 ml de una solución al 2 % de ácido cítrico y 0,27 ml de solución de formaldehído al 35 % con agua a 500 ml.

Solución de bloqueo - Emplear una solución al 10 % v/v de ácido acético.

Procedimiento - Introducir el gel en exceso en *Solución de fijación* durante 1 hora. Eliminar la *Solución de fijación*, agregarla de nuevo e incubar otra vez durante por lo menos 1 hora o durante toda la noche, si es conveniente. Eliminar la *Solución de fijación* y lavar el gel con abundante agua durante 1 hora. Embeber el gel durante 15 minutos en una solución de glutaraldehído al 1 % v/v. Lavar el gel dos veces durante 15 minutos con abundante agua. Embeber el gel en *Reactivo de nitrato de plata* recientemente preparado, durante 15 minutos, en la oscuridad. Lavar el gel tres veces durante 5 minutos con abundante agua, sumergirlo durante aproximadamente 1 minuto en *Solución de desarrollo* hasta que se obtenga una tinción satisfactoria. Detener el desarrollo por incubación en *Solución de bloqueo* durante 15 minutos y lavar el gel con agua.

DESECADO DE GELES DE POLIACRILAMIDA SDS TEÑIDOS

Los geles se someten a diferentes tratamientos, dependiendo del método empleado para teñirlos. Cuando se emplea *Tinción con Coomassie*, luego de la etapa de decoloración, colocar el gel en una solución al 10 % de glicerol durante por lo menos 2 horas, siendo posible una incubación durante toda la noche. Cuando se emplea *Tinción con plata*, al finalizar el proceso de lavado, sumergir los geles en una solución al 2 % de glicerol, durante 5 minutos.

Sumergir dos hojas de celulosa porosa en agua durante 5 a 10 minutos, colocar una de las hojas en el cuadro de secado, levantar el gel cuidadosamente y colocarlo sobre la hoja de celulosa. Eliminar las burbujas de aire que eventualmente puedan haber sido retenidas y algunos ml de agua a lo largo de los bordes del gel. Recubrir con la segunda hoja de papel y eliminar nuevamente las posibles burbujas de aire retenidas. Colocar en estufa para completar el secado o dejar secar a temperatura ambiente.

DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR

El peso molecular de las proteínas se determina mediante comparación de sus respectivas movilidades con las de varios marcadores de peso molecular conocido. Para la calibración de los geles se dispone de mezclas de proteínas de peso molecular conocido, que permiten obtener una tinción uniforme. Las soluciones madre concentradas de proteínas de peso molecular conocido preparadas en la solución reguladora de muestra se aplican en el mismo gel contiene la muestra de la proteína a analizar.

Inmediatamente después del desarrollo electroforético, señalar la posición del indicador, azul de bromofenol, para identificar el frente de migración de los iones. Después de la tinción, medir las distancias de migración de cada banda proteica (marcadores y muestras). Dividir la distancia de migración de cada proteína por la distancia de migración del indicador. Las distancias de migración normalizadas así obtenidas se denominan movilidades relativas de las proteínas (relativas al frente del indicador) y, por convención, se expresan como R_f. Graficar el logaritmo de los pesos moleculares relativos (M_r) de las proteínas patrón en función de los valores de R_f. Los pesos moleculares desconocidos se pueden determinar por regresión lineal o por interpolación a partir de las curvas obtenidas; los valores obtenidos para las muestras se deben encontrar contenidos en la parte lineal del gráfico.

VALIDACIÓN DEL ENSAYO

El ensayo sólo es válido si las proteínas empleadas como marcadores de pesos moleculares se distribuyen a lo largo del 80 % de la longitud del gel y además si, en el intervalo de separación requerido, la separación obtenida para las bandas de proteínas relevantes, presenta una relación lineal entre el logaritmo de peso molecular y el R_f. En la monografía correspondiente se especifican los requisitos de validación adicionales referentes a la solución muestra.

CUANTIFICACIÓN DE IMPUREZAS

Cuando en la monografía se especifica el límite de impurezas, se debe preparar una solución de referencia correspondiente al nivel de impureza especificado, por dilución de la solución muestra. En el electroforegrama obtenido a partir de la solución muestra, ninguna impureza (ni ninguna banda, a excepción de la principal) puede ser más intensa que la banda principal obtenida a partir de la solución de referencia.

Cuando se trabaja en las condiciones validadas, es posible cuantificar las impurezas por normalización con relación a la banda principal, empleando un densitómetro. En estos casos, se debe comprobar la linealidad de las repuestas.

Tabla 1. Preparación del gel de resolución.

Componentes de la solución de acrilamida	Volumen de cada componente por volumen de gel de moldeado (ml)							
	5	10	15	20	25	30	40	50
6 %								
Agua	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Solución de acrilamida (1)	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
Tris pH 8,8 (1,5 M) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
SDS 10 % (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
PSA 10 % (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED (5)	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
8 %								
Agua	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Solución de acrilamida (1)	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3
Tris pH 8,8 (1,5 M) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
SDS 10 % (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
PSA 10 % (4)-	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED (5)	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10 %								
Agua	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Solución de acrilamida (1)	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
Tris pH 8,8 (1,5 M) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
SDS 10 % (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
PSA 10 % (4)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 %								
Agua	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Solución de acrilamida (1)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
Tris pH 8,8 (1,5 M) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
SDS 10 % (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
PSA 10 % (4)-	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Tabla 1 - continuación. Preparación del gel de resolución.

Componentes de la solución de acrilamida	Volumen de cada componente por volumen de gel de moldeado (ml)							
	5	10	15	20	25	30	40	50
14 %								
Agua	1,4	2,7	3,9	5,3	6,6	8,0	10,6	13,8
Solución de acrilamida (1)	2,3	4,6	7,0	9,3	11,6	13,9	18,6	23,2
Tris pH 8,8 (1,5 M) (2)	1,2	2,5	3,6	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
SDS 10 % (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
PSA 10 % (4)-	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
15 %								
Agua	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Solución de acrilamida (1)	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
Tris pH 8,8 (1,5 M) (2)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
SDS 10 % (3)	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
PSA 10 % (4)-	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED (5)	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Tabla 2. Preparación del gel de apilamiento.

Componentes de la solución	Volumen de cada componente por volumen de gel de moldeado (ml)							
	1	2	3	4	5	6	8	10
Agua	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Solución de acrilamida (1)	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,00	1,3	1,7
Tris pH 6,8 (1,0 M) (2)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
SDS 10 % (3)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
PSA 10 % (4)-	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED (5)	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

1 - Solución de acrilamida: solución de acrilamida/bisacrilamida (29:1) al 30 % - Preparar una solución que contenga 290 g de archilamida y 10 g de metilenbisacrilamida por litro de agua.
2 - Tris pH 8,8 (1,5 M): solución reguladora tris – clorhídrico de pH 8,8 con ácido clorhídrico (1,5 M) - Disolver 90,8 g de tris(hidroximetil)aminoetano en 400 ml de agua. Ajustar a pH 8,8 con ácido clorhídrico y completar a 500 ml con agua.
3 - SDS 10 %: solución de laurilsulfato de sodio al 10 %.

4 - PSA 10 %: solución de persulfato de amonio al 10 %. El persulfato de amonio forma los radicales libres que inducen la polimerización de la acrilamida y la bisacrilamida. Esta solución se descompone lentamente y debe renovarse cada semana.
5 - TEMED: tetrametiletilendiarnina.
6 - Tris pH 6,8 (1,0 M): solución reguladora tris-clorhídrico de pH 6,8 (1,0 M) - Disolver 60,6 g de tris(hidroximetil)aminoetano en 400 ml de agua. Ajustar a pH 6,8 con ácido clorhídrico y completar a 500 ml con agua.

310. ENSAYO DE DISGREGACIÓN

Por medio de este ensayo se determina si la forma farmacéutica se disgrega dentro de un lapso de tiempo determinado, en las condiciones especificadas. Este ensayo se aplica a comprimidos y cápsulas con excepción de aquellos que estén diseñados como formas farmacéuticas de liberación modificada (ver *530. Liberación de principios activos*) y comprimidos masticables.

En este ensayo la disgregación no implica disolución completa de la unidad o de su principio activo. Disgregación completa se define como el estado en el que el residuo de la unidad que quede sobre la malla metálica del aparato, excepto fragmentos insolubles de la cubierta o de la cápsula, sea una masa blanda sin restos duros palpables.

Aparato (ver *Figura*) - Consta de un vaso de precipitados de 1 litro donde se sumerge una cesta que oscila verticalmente con una frecuencia constante de 29 a 32 ciclos por minuto, recorriendo una distancia de no menos de 5,3 cm y no más de 5,7 cm. El volumen de líquido en el recipiente debe ser tal que cuando la cesta se encuentre en el punto más alto del recorrido ascendente, la malla metálica permanezca al menos 2,5 cm debajo de la superficie del líquido y descienda a no menos de 2,5 cm del fondo del recipiente cuando se encuentre en el punto más bajo del recorrido descendente. El tiempo requerido para llegar al punto más alto debe ser igual al tiempo requerido para alcanzar el punto más bajo y el cambio de dirección debe ser una transición suave. La cesta se debe desplazar verticalmente a lo largo de su eje sin desviarse.

Cesta - La cesta consta de seis tubos transparentes de extremos abiertos, de 77,5 ± 2,5 mm de longitud, diámetro internó de aproximadamente 21,5 mm y pared de aproximadamente 2 mm de espesor. Los tubos se mantienen en posición vertical por medio de dos placas, cada una de aproximadamente 9 cm de diámetro y 6 mm de espesor con seis orificios, cada uno de aproximadamente 21,5 mm de diámetro, equidistantes del centro de la placa y a la misma distancia uno de otro. La malla metálica, de acero inoxidable (con hilo de 0,602 a 0,655 mm de diámetro) y de trama cuadrada con 15,5 aberturas por cm^2, se fija a la cara inferior de la placa inferior. Las partes del aparato se sostienen firmemente por medio de tres pernos que pasan a través de las dos placas. El eje de la cesta se suspende de modo apropiado del dispositivo mecánico que proporcione el movimiento vertical.

El diseño de la cesta puede modificarse siempre que se mantengan las especificaciones para los tubos de vidrio y el tamaño de la malla metálica.

Discos - Cada tubo está provisto de un cilindro, ranurado y perforado, de 9,50 ± 0,15 mm de espesor y 20,70 ± 0,15 mm de diámetro. El disco está construido de material plástico, transparente y de densidad relativa entre 1,18 y 1,20. Entre ambas caras del cilindro se extienden cinco orificios de 2 mm de diámetro, uno de ellos pasa a través del eje del cilindro y los otros están centrados a 6 mm del eje, en líneas imaginarias perpendiculares al eje. En las paredes del cilindro están tallados cuatro planos trapezoidales idénticos, casi perpendiculares a las caras del cilindro. La forma trapezoidal es simétrica, sus lados paralelos coinciden con las caras del cilindro y son paralelos a una línea imaginaria que une los centros de dos orificios adyacentes a 6 mm del eje del cilindro. El lado paralelo del trapezoide en la base del cilindro tiene una longitud de 1,6 mm y su centro está ubicado a una profundidad de 1,8 mm desde la circunferencia del cilindro. El lado paralelo del trapezoide en la parte superior del cilindró tiene una longitud de 9,2 mm y su centro está a una profundidad de 2,6 mm desde la circunferencia del cilindro. Todas las superficies del disco son lisas. Los discos deben emplearse sólo cuando se indique en *Procedimiento*. En dichos casos luego de introducir comprimido agregar un disco a cada tubo, poner en funcionamiento el equipo y continuar con el ensayo según se indica en *Procedimiento*.

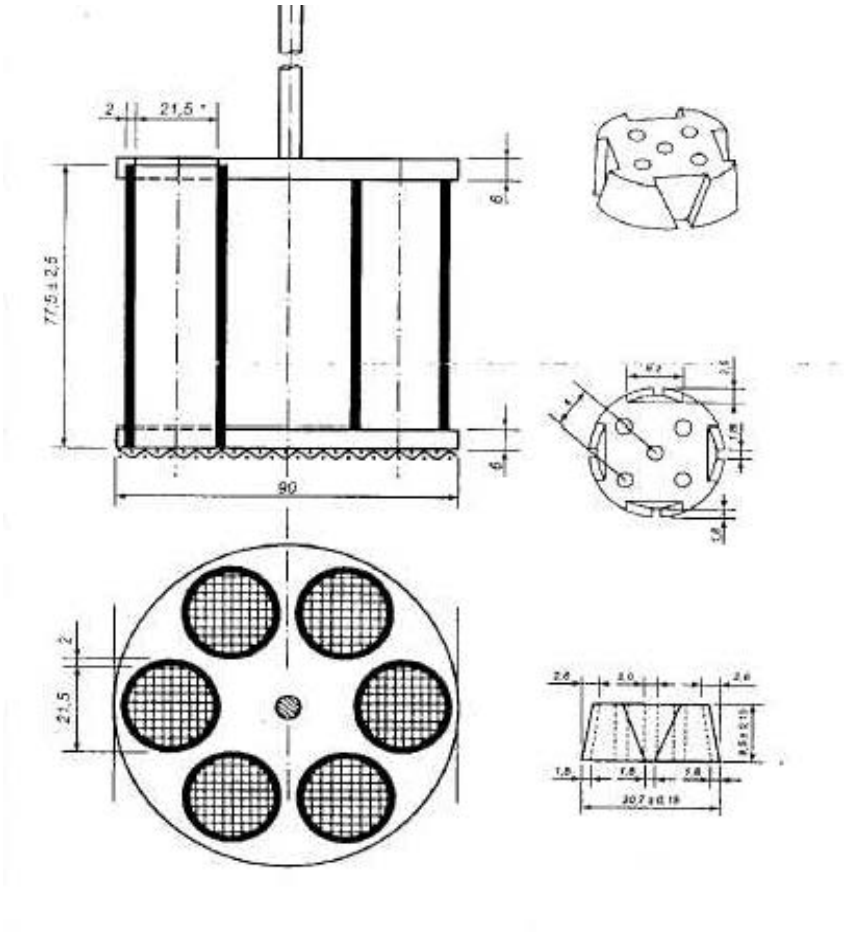


Figura. Aparato para el ensayo de disgregación.

Procedimiento

Comprimidos no r ecubiertos - Colocar un comprimido en cada uno de los seis tubos de la cesta, agregar los *Discos* e iniciar el movimiento vertical, emplear agua a 37,0 ± 2,0 °C como medio de inmersión y un tiempo de 30 minutos, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Transcurrido dicho tiempo, levantar la cesta del líquido y observar los comprimidos: todos los comprimidos deben haberse disgregado completamente. Si sólo uno de los comprimidos no se disgregara completamente, repetir el ensayo con seis comprimidos adicionales: los comprimidos cumplen con el ensayo si todos los comprimidos adicionales se disgregan completamente.

Comprimidos con cubiertas simples - Proceder según se indica para *Comprimidos no recubiertos*. Poner en funcionamiento el aparato durante 60 minutos o por el tiempo especificado en la monografía correspondiente.

Comprimidos con cubierta entérica - Colocar un comprimido en cada uno de los seis tubos de la cesta y agregar los *Discos*. Si los comprimidos poseen un recubrimiento externo soluble, sumergir la cesta en agua a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego poner en funcionamiento el equipo empleando fluido gástrico simulado (SR), mantenido a 37,0 ± 2,0 °C, como líquido de inmersión. Después de 2 horas, levantar la cesta del líquido y observar los comprimidos: no deben presentar evidencias de disgregación, resquebrajamiento o ablandamiento. Si dos o más comprimidos presentan evidencias de disgregación, resquebrajamiento o ablandamiento, repetir el ensayo con seis comprimidos adicionales: los comprimidos cumplen con esta etapa si ninguno de los comprimidos adicionales se disgregan

completamente. A continuación sumergir la cesta en fluido intestinal simulado (SR), mantenido a 37,0 ± 2,0 °C, durante 60 minutos o por el tiempo especificado en la monografía correspondiente. Levantar la cesta del líquido y observar los comprimidos: todos los comprimidos deben disgregarse completamente. Si sólo uno de los comprimidos no se disgrega completamente, repetir el ensayo con seis comprimidos adicionales: los comprimidos cumplen con en el ensayo si todos los comprimidos adicionales se disgregan completamente.

Comprimidos sublinguales - Proceder según se indica para *Comprimidos no recubiertos*. Observar los comprimidos a los 2 minutos o al tiempo especificado en la monografía correspondiente: todos los comprimidos deben disgregarse. Si sólo uno de los comprimidos no se disgrega completamente, repetir el ensayo con seis comprimidos adicionales: los comprimidos cumplen con el ensayo si todos los comprimidos adicionales se disgregan completamente.

Cápsulas rígidas - Proceder según se indica para *Comprimidos no recubiertos*. Colocar una malla metálica desmontable según se describe en *Cesta* sobre la superficie de la placa superior de la cesta. Observar las cápsulas a los 30 minutos o al tiempo especificado en la monografía correspondiente: todas las cápsulas deben disgregarse excepto los fragmentos de la cápsula. Si sólo una de las cápsulas no se disgregara completamente, repetir el ensayo con seis cápsulas adicionales: las cápsulas cumplen con el ensayo si todas las cápsulas adicionales se disgregan completamente.

Cápsulas blandas - Proceder según se indica en *Cápsulas rígidas*.

Comprimidos dispersables - Aplicar este ensayo a aquellos comprimidos no recubiertos destinados a dispersarse en agua antes de su administración. Proceder según se indica para *Comprimidos no recubiertos*. Observar los comprimidos a los 3 minutos o al tiempo especificado en la monografía correspondiente empleando agua, mantenida entre 19 y 21 °C, como líquido de inmersión: todos los comprimidos deben disgregarse. Si sólo uno de los comprimidos no se disgregara o disolviera completamente, repetir el ensayo con seis comprimidos adicionales: los comprimidos cumplen con el ensayo si todos los comprimidos adicionales se disgregan o se disuelven completamente.

Comprimidos efervescentes - Transferir un comprimido efervescente a un vaso de precipitados que contiene 200 ml de agua entre 15 y 25 °C, se observará un abundante desprendimiento de burbujas. Cuando la evolución de gas alrededor del comprimido o sus fragmentos haya cesado, el comprimido debe haberse disuelto o disgregado completamente. Repetir el procedimiento con cinco comprimidos adicionales. El producto cumple con el ensayo si los seis comprimidos ensayados se disuelven o disgregan completamente dentro de los 5 minutos o en el tiempo especificado en la monografía correspondiente.

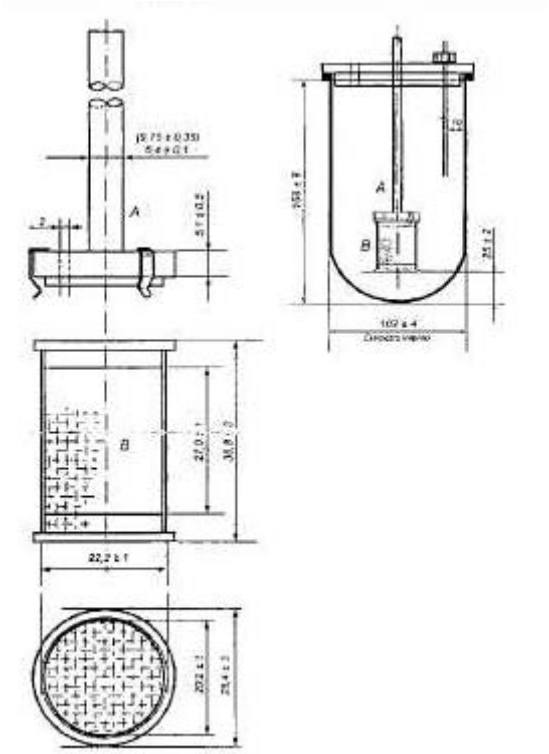
320. ENSAYO DE DISOLUCIÓN

Este ensayo se emplea para determinar el comportamiento de la disolución de los principios activos contenidos en una forma farmacéutica sólida de uso oral, estableciendo un criterio de evaluación de las propiedades físicas y biofarmacéuticas del producto. Los métodos descriptos se aplican en las monografías que establecen un límite de principio activo disuelto bajo el título *Disolución*.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, este ensayo no se aplica a comprimidos cuyo rótulo indica que deben masticarse antes de ingerirse. Cuando se declara que un producto posee cubierta entérica y la monografía correspondiente incluye un ensayo de disolución o de disgregación que no es específico para productos con cubierta entérica, se aplica el ensayo para *Productos de liberación retardada* en *<530>*. *Liberación de principios activos*, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Aparato 1 (ver *Figura 1*) - Consta de: un vaso transparente provisto de una tapa, construido de vidrio u otro material inerte, un eje metálico y un canastillo cilíndrico. El vaso debe estar parcialmente sumergido en un baño de agua que permita mantener la temperatura dentro del vaso a 37,0 ± 0,5 °C durante el ensayo. Ninguna parte del aparato, ni el área donde está instalado, debe producir movimiento significativo, agitación o vibración más allá de la debida al elemento de agitación. El vaso es cilíndrico con fondo semiesférico con una altura de 185 ± 25 mm, un diámetro interior de 102 ± 4 mm y una capacidad nominal de 1 litro. El vaso puede tener una tapa para retardar la evaporación. El eje se coloca de manera que su vertical no se separe más de 2 mm, en cualquier punto, del eje vertical del vaso y rote sin desviaciones significativas. El aparato posee además, un dispositivo que permite seleccionar la velocidad de rotación de los ejes de acuerdo a lo especificado en la monografía correspondiente y mantenerla dentro de ± 4 %.

El eje y el canastillo deben ser de acero inoxidable, tipo 316 o equivalente, según las especificaciones que se muestran en la *Figura 1*. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente se debe emplear tela metálica de malla N° 40. Puede emplearse un canastillo con una cubierta de oro de 2,5 µm de espesor. Esta cubierta le otorga resistencia a la corrosión especialmente cuando se emplean medios de disolución de pH ácido. El comprimido o la cápsula se coloca en un canastillo seco al comienzo de cada ensayo. Cuando la unidad de dosificación tiende a flotar se le puede enrollar unas pocas vueltas de un alambre inerte, para evitar que esto ocurra. En estos casos se debe evitar que el alambre sea colocado en forma ajustada lo que podría interferir con los resultados. Se pueden emplear otros dispositivos para evitar la flotación, siempre y cuando hayan sido debidamente validados. A menos que en la monografía correspondiente se especifique otro valor, la distancia entre el fondo del vaso y el canastillo se debe mantener a 25 ± 2 mm durante el ensayo.



Aparato 2 - Se trata básicamente del mismo aparato descripto en *Aparato 1*, pero en este caso el elemento de agitación es una paleta que se ajusta a las especificaciones dadas en la *Figura 2*. La paleta se coloca de tal modo que su eje vertical no se separe más de 2 mm, en cualquier punto, del eje vertical del vaso y rote sin desviarse significativamente. A menos que en la monografía correspondiente se especifique otro valor, la distancia entre el borde inferior de la paleta y el fondo del vaso se debe mantener a 2 5 ± 2 mm durante el ensayo. La paleta puede recubrirse con un material inerte apropiado. El comprimido o la cápsula se coloca en el vaso, de modo que se

deposite en el fondo, antes de que comience la rotación de la paleta. Cuando la unidad de dosificación tiende a flotar se le puede enrollar unas pocas vueltas de un alambre inerte, para evitar que esto ocurra. En estos casos se debe evitar que el alambre sea colocado en forma ajustada lo que podría interferir con los resultados. Se pueden emplear otros dispositivos para evitar la flotación, siempre y cuando hayan sido debidamente validados.

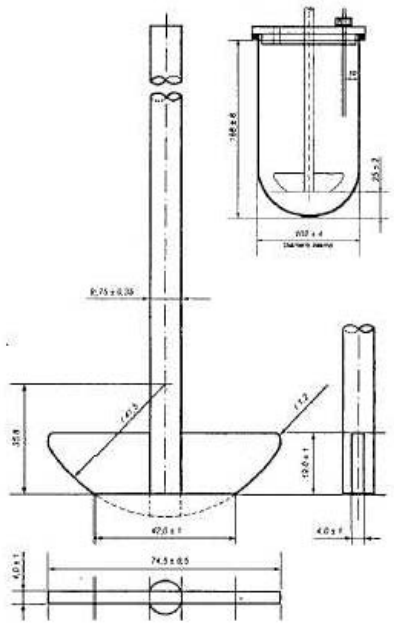


Figura 2. Aparato 2 (las dimensiones son en mm).

Medio - El medio de disolución es preferentemente agua desgasificada. Pueden emplearse, según las características de solubilidad del principio activo o de la formulación, soluciones reguladoras de pH 4 a 8 o ácido clorhídrico 0,001 a 0,1 N. El volumen empleado es 900 ml pudiendo variar entre 500 y 900 ml. Si el medio es una solución reguladora, ajustar el pH a ± 0,05 unidades del pH especificado en la misma. Los gases disueltos pueden producir burbujas que pueden modificar los resultados del ensayo. En esos casos los mismos deben eliminarse antes del ensayo. Para ello puede emplearse el siguiente método: calentar el medio a 45 °C aproximadamente, agitando suavemente, filtrar inmediatamente aplicando vacío empleando un filtro de 0,45 µm o por osidad menor, agitando vigorosamente y continuar la agitación aplicando vacío aproximadamente durante 5 minutos. Pueden emplearse otras técnicas de desgasificación validadas.

Tiempo - Si se especifican dos o más tiempos, las muestras se retirarán sólo en los tiempos especificados con una tolerancia de ± 2 %.

Muestreo individual -

Procedimiento - Este procedimiento se realiza sobre seis unidades de la forma farmacéutica. Colocar en cada uno de seis vasos el volumen de *Medio* especificado, colocar los vasos en el equipo, equilibrar el *Medio* a 37,0 ± 0,5 °C y retirar los termómetros. Colocar un c omprimido o un a cápsula en cada vaso, teniendo cuidado de excluir las burbujas de aire de la superficie de la unidad de dosificación y de inmediato, iniciar la rotación del elemento de agitación a l a velocidad especificada en la monografía correspondiente. Cumplido el tiempo especificado, o a cada uno de los tiempos establecidos, retirar una alícuota de una zona a una distancia media entre la superficie del *Medio* y la parte superior del canastillo o de la paleta rotatoria y a no menos de 10 mm de la pared del vaso. [NOTA: reemplazar las alícuotas retiradas para el análisis con volúmenes iguales de *Medio* calentado a 37 °C o, cuando se demuestra que la reposición de medio no es necesaria, aplicar en los cálculos una corrección por el cambio de volumen]. Mantener el vaso cubierto durante el tiempo que dure el ensayo y verificar la temperatura dentro de cada vaso a intervalos apropiados. Filtrar y analizar las alícuotas extraídas según se especifica en la monografía correspondiente. [NOTA: emplear un filtro inerte que no produzca adsorción del principio activo o contenga sustancias extraíbles que

interfieran el análisis. Si se emplea un equipo con toma de muestra automática; cada vez que se introduzcan modificaciones en el equipo, es necesaria la validación del mismo para demostrar que no hay cambios durante el desarrollo del ensayo].

Cuando la cubierta de la cápsula interfiere con el análisis, extraer el contenido de no menos de seis cápsulas y disolver las cubiertas de las cápsulas en el volumen especificado de *Medio*. Realizar el análisis según se especifica en la monografía correspondiente, empleando la solución anterior como blanco y hacer las correcciones necesarias. El factor de corrección no debe ser mayor de 25 % del contenido declarado.

Muestreo unificado -

Procedimiento - Emplear este procedimiento cuando en la monografía correspondiente se especifique un *Procedimiento para muestreo unificado*. Proceder según se indica en *Muestreo individual* pero combinar volúmenes iguales de las alícuotas filtradas, extraídas de cada uno de los vasos y emplear la muestra unificada como solución muestra. Determinar la cantidad promedio de principio activo disuelto en la muestra unificada.

Interpretación -

Muestreo individual - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos se cumplen si la cantidad de principio activo disuelto se ajusta a la *Tabla 1*. En caso que los resultados no se ajusten al límite especificado en E_1 continuar el ensayo con E_2 y si no cumple con la exigencia de E_2 proseguir hasta E_3.. La cantidad, Q, es la cantidad de principio activo disuelto, especificada en la monografía correspondiente, expresada como un porcentaje del contenido declarado. Los valores de 5, 15 y 25 % en la *Tabla 1* corresponden a porcentajes del contenido declarado de modo que estos valores y Q están en los mismos términos.

Tabla 1. Aceptación para muestreo individual

Etapa	Unidades ensayadas	Criterios de aceptación
E_1	6	Cada unidad no debe ser menor de $Q + 5$ %.
E_2	6	El promedio de 12 unidades ($E_1 + E_2$) debe ser igual o mayor de Q y ninguna unidad menor de $Q - 15$ %.
E_3	12	El promedio de 24 unidades ($E_1 + E_2 + E_3$) debe ser igual o mayor de Q, no más de 2 unidades menores de $Q - 15$ % y ninguna unidad menor de $Q - 25$ %.

Muestreo unificado - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos se cumplen si la cantidad de principio activo disuelto en la muestra unificada se ajusta a la *Tabla 2*. En caso de que los resultados no se ajusten al límite especificado en E_1 continuar el ensayo con E_2 y si no cumple con la exigencia de E_2, proseguir hasta E_3. La cantidad, Q, es la cantidad de principio activo disuelto, especificada en la monografía correspondiente, expresada como un porcentaje del contenido declarado. Los valores de 5 y 10 % en la *Tabla 2* corresponden a porcentajes del contenido declarado de modo que estos valores y Q están en los mismo términos.

Tabla 2. Aceptación para muestreo unificado

Etapa	Unidades ensayadas	Criterios de aceptación
E_1	6	Cada unidad no debe ser menor de $Q + 10$ %.
E_2	6	La cantidad promedio disuelta ($E_1 + E_2$) debe ser igual o mayor de $Q + 5$ %.
E_3	12	La cantidad promedio disuelta ($E_1 + E_2 + E_3$) debe ser igual o mayor de Q.

330. ENSAYOS DE ENDOTOXINAS BACTERIANAS

El ensayo de endotoxinas bacterianas se aplica a la determinación o cuantificación de endotoxinas provenientes de las bacterias Gram negativas, empleando como reactivo, lisados de amebocitos circulantes del cangrejo herradura de *Limulus polyphemus* (ensayo LAL), de *Tachypleus tridentatus*, etc. Cuando se enfrenta el reactivo a soluciones que contienen endotoxinas produce gelificación. La reacción requiere la presencia de cationes bivalentes. La velocidad de la reacción depende de la concentración de endotoxina, del pH y de la temperatura. El lisado contiene un sistema enzimático que actúa en cascada y que se activa progresivamente en presencia de endotoxinas. Como resultado final, la proteína coagulable (coagulógeno) se transforma en un gel (coagulina), siendo la base del método de gel en tubo.

Se han desarrollado otros métodos basados en los cambios turbidimétricos que ocurren durante la formación del gel y métodos cromogénicos, basados en el desarrollo de color luego del clivaje de un péptido sintético que contiene un cromóforo. Estos métodos permiten estimaciones cuantitativas del contenido de endotoxina, mientras que el método de gel en tubo se emplea como ensayo límite y también como método semicuantitativo. Los métodos cuantitativos podrán emplearse si satisfacen los requisitos para métodos alternativos (ver *Consideraciones generales*) pero, en caso de discrepancias, el resultado obtenido con el método de gel en tubo es el definitorio.

Los métodos descriptos en este capítulo son:

a) gel en tubo: ensayo límite y semicuantitativo;

b) cromogénico de punto final;

c) cinético cromogénico;

d) cinético turbidimétrico.

El ensayo debe realizarse en condiciones tales de evitar la contaminación microbiana.

Antes de llevarlo a cabo es necesario verificar:

1) que todos los materiales y reactivos a usar no contengan endotoxinas bacterianas.

2) la sensibilidad del lisado, λ, de acuerdo a los requisitos posteriormente descriptos en cada método.

3) la ausencia de factores interferentes en las muestras a analizar. Los resultados son válidos siempre que se haya demostrado previamente que las muestras a analizar no inhiban ni intensifiquen la reacción.

Materiales y reactivos

Es necesaria la aplicación de tratamientos controlados para la eliminación de endotoxinas. Para el material de vidrio, el método más empleado es el calentamiento a 250 °C por lo menos durante 30 minutos o 180 °C durante 3 horas. Si se emplean materiales plásticos de único uso (microplacas, puntas para pipetas automáticas, etc.) es necesario verificar que los mismos estén libres de endotoxinas y que no interfieran con el ensayo.

Agua reactivo - El agua empleada en este ensayo debe estar libre de endotoxinas. Puede ser preparada por destilación doble o triple y debe ser recolectada en envases convenientemente despirogenados. Es necesario efectuar el control de calidad de la misma, que debe cumplir con las condiciones del ensayo.

Reactivo LAL (Lisado de Amebocitos) - Reconstituir el lisado según se indica en el rótulo y/o prospecto. La sensibilidad del lisado, λ, establecida en el rótulo y que debe ser confirmada, se expresa en Unidades de Endotoxina por ml (UE/ml).

Otras soluciones - El ácido clorhídrico 0,1 N y el hidróxido de sodio 0,1 N, empleados para ajustar el pH entre 6,0 y 8,0, deben prepararse con *Agua reactivo*.

Endotoxina de referencia y Endotoxina control - Existe una *Endotoxina de referencia internacional*. Se designa a la unidad de endotoxina como unidad internacional, siendo la relación 1 UI = 1 UE. En esta Farmacopea se designa a la unidad como UE (Unidad de endotoxina).

La *Endotoxina control* es una preparación de endotoxina distinta de la *Endotoxina de referencia*, que se ha calibrado contra esta última. Las endotoxinas deben ser reconstituidas con *Agua reactivo*, mediante agitación con mezclador por vórtice, de acuerdo a las indicaciones de los rótulos y certificados de calibración. Estos concentrados se pueden conservar en heladera el tiempo especificado por el elaborador. Para la preparación de soluciones de endotoxinas, agitar vigorosamente con mezclador por vórtice los concentrados de endotoxinas durante no menos de 5 minutos y preparar diluciones seriadas en *Agua reactivo* con tiempos de agitación que pueden variar entre 30 segundos y 1 minuto. No se deben almacenar las diluciones porque pueden perder actividad por adsorción al vidrio.

Límite de Endotoxinas

En las monografías individuales de materia prima y producto terminado, bajo el subtítulo de *Ensayo de endotoxinas bacterianas* se indica el límite de endotoxinas requerido para el producto.

Es necesario demostrar que los productos a analizar contienen una concentración de endotoxinas bacterianas menor al límite especificado. La misma se expresa en unidades entotóxicas por peso (UE/mg), por droga activa (UE/UI) o por volumen (UE/ml).

Cuando no se cuenta con especificación de límite de endotoxinas en las monografías, se puede calcular tomando en cuenta la dosis y vía de administración, empleando la dosi siguiente:

$$K/M$$

en la cual K es la dosis máxima de endotoxinas admitida (UE) por Kg de peso corporal en humano y M es la dosis máxima (en mg o UI) recomendada para ser administrada por Kg de peso corporal en humanos.

-Para administración parenteral K es igual a 5 UE/Kg.

- Para administración intratecal K es igual a 0,2 UE/Kg.

Para productos (usualmente cancerígenos) administrado por metro cuadrado de superficie corporal, la fórmula es:

$$K/M$$

en la cual K es igual a 5 UE/Kg y M es [(máxima dosis/m^2/hora) × 1,80 m^2]/70 Kg.

Para productos radiofármacos de administración parenteral el límite de endotoxinas se calcula empleando la fórmula siguiente:

$$175/V$$

y para la administración intratecal,

$$14/V$$

en la cual V es la dosis máxima recomendada en ml para ser administrada en humanos.

MÉTODO DE GEL EN TUBO

El método de gel en tubo permite establecer la presencia de endotoxinas bacterianas empleándose como ensayo límite o como determinación semicuantitativa; el punto final es la constitución de un gel firme. La determinación del punto final de la reacción se hace mediante comparación directa con una *Endotoxina control* o *de referencia*; y las cantidades de endotoxina se expresan en las unidades de endotoxinas definidas. El pH de la mezcla a ensayar y del *Reactivo LAL* debe estar comprendido entre 6,0 y 8,0, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. El pH puede ajustarse, antes del ensayo, por el agregado de hidróxido de sodio 0,1 N, ácido clorhídrico 0,1 N o soluciones reguladoras apropiadas estériles y libres de endotoxinas.

La determinación de endotoxinas sobre dispositivos médicos debe realizarse sobre extractos, eluatos o soluciones de lavado según la naturaleza del dispositivo.

Antes de llevar a cabo la determinación, se deben realizar los ensayos de confirmación de sensibilidad del lisado y de inhibición o intensificación.

Ensayo para la confirmación de la sensibilidad del lisado

La sensibilidad del lisado se define como la menor concentración de endotoxinas que puede formar un gel firme en las condiciones del ensayo. Se debe confirmar la sensibilidad indicada en el rótulo del *Reactivo LAL* de cada lote, empleando *Endotoxina control* o *de referencia*.

Preparar una serie de diluciones de *Endotoxina control* o *de referencia* con concentraciones de 2 λ; 1 λ; 0,5 λ y 0,25 λ, por cuadruplicado; siendo λ, la sensibilidad declarada en el rótulo del *Reactivo LAL* en UE/ml. Incluir controles negativos. La media geométrica en el punto final (ver *Cálculos*) debe ser mayor o igual a 0,5 λ, y menor o igual a 2 λ.

Máxima dilución válida (MDV)

La máxima dilución válida es la dilución máxima de la muestra que corresponde a la máxima dilución en la cual el límite de endotoxina puede ser determinado en las condiciones del ensayo.

Se aplica a soluciones inyectables o a soluciones de administración parenteral reconstituidas o diluidas para su administración o, cuando sea aplicable, a la droga en peso si el volumen de administración de la forma farmacéutica pudiera ser variable.

El cálculo se realiza empleando la fórmula siguiente:

$$MDV = L_E C / \lambda$$

en la cual L_E representa el límite de endotoxina y C la concentración del principio activo en la solución a ensayar o reconstituido, que según las especificaciones del elaborador puede estar dada en:

- mg por ml, sí el límite de endotoxina especificado en la monografía es en UE/mg.

- UI/ml, si el límite de endotoxina especificado en la monografía es en UE/UI.

Cuando en la monografía, el límite de endotoxina especificado es en UE/ml, se debe dividir el límite de endotoxina por λ (que es la sensibilidad del lisado, en UE/ml, declarada en el rótulo).

Ensayo de inhibición o intensificación

El ensayo de inhibición o intensificación se debe repetir cada vez que se emplee un nuevo lote de *Reactivo LAL* o la formulación del producto.

Llevar a cab o el ensayo sobre alícuotas de la muestra o sobre una dilución que no exceda la máxima dilución válida (MDV), en las cuales no exista endotoxina detectable. El ensayo se realiza sobre la muestra sin adición y con adición de endotoxina; en este caso, preparar las diluciones de muestra de manera de obtener concentraciones finales de endotoxina de 2,0 λ; 1,0 λ; 0,5 λ; 0,25 λ. Probar en paralelo las mismas concentraciones de endotoxina en *Agua reactivo* y los controles negativos de éste. Ensayar cada solución al menos por cuadruplicado. Calcular la media geométrica de la concentración del punto final según se indica en *Cálculos*.

El ensayo sólo es válido si la sensibilidad del *Reactivo LAL*, determinada en presencia de la preparación ensayada, no difiere en más de un factor de 2 con respecto a la determinada en *Agua reactivo*; es decir, si la media geométrica de la concentración del punto final en la muestra con endotoxina es mayor o igual que 0,5 λ, y menor o igual que 2 λ,. Si el análisis indica inhibición o intensificación repetir el ensayo empleando las muestras diluidas apropiadamente por un factor que no exceda la MDV. De este modo, para subsecuentes determinaciones de endotoxina en las muestras se debe emplear la dilución que no exceda la MDV y sea suficiente para superar la inhibición o intensificación.

Otras formas de eliminar interferencias, además de las diluciones, pueden ser filtraciones, neutralizaciones, diálisis o adición de sustancias que desplacen la endotoxina adsorbida. El empleo de un *Reactivo LAL* de mayor sensibilidad permite realizar diluciones mayores de las preparaciones a ensayar y contribuye a la eliminación de interferencias. Si bajo las condiciones del ensayo de inhibición o intensificación son detectadas endotoxinas endógenas en las muestras no tratadas, las mismas pueden adecuarse separando la endotoxina presente por ultrafiltración, siempre y cuando esta metodología permita la separación de la endotoxina del producto.

Procedimiento - Transferir a sendos tubos de ensayo de 10 mm × 75 mm, los volúmenes indicados de: controles negativos, las diluciones seleccionadas de *Endotoxina control* o *de referencia*, la muestra sin diluir y/o las diluciones de la muestra a ensayar y los controles positivos de ésta/s (preparados por la adición de una concentración de endotoxina igual a 2 λ). Agregar a cada tubo volúmenes iguales de *Reactivo LAL* reconstituido y agitar suavemente para mezclar. Colocar en un dispositivo para incubar, como por ej., un baño de agua o un calefactor apropiado, registrando exactamente la hora. Los tubos de reacción deben ser incubados simultáneamente en las mismas condiciones y realizarse al menos por duplicado. Incubar sin agitar, durante 60 ± 2 minutos a 37 ± 1 °C y retirar cada tubo cuidadosamente para su observación. Un resultado positivo (+) se caracteriza por la formación de un gel firme que se mantiene cuando se invierte el tubo 180°. Un resultado negativo (-) se caracteriza por la ausencia del gel o por la formación de un gel viscoso que no mantiene su integridad al invertir el tubo 180°. [NOTA: manipular los tubos con cuidado y evitar someterlos a vibraciones indeseables, porque de lo contrario pueden resultar falsos negativos].

Ensayo límite

Se aplica cuando el objetivo del ensayo es comprobar que el producto a ensayar presenta un contenido se endotoxinas menor al especificado en la monografía correspondiente. Se prepara la muestra o la dilución de la misma determinada en *Ensayo de inhibición o i ntensificación*, que no exceda la MDV. El control positivo de la muestra se prepara mediante el agregado de una concentración de endotoxina igual a 2 λ. El control negativo es *Agua reactivo*. Se prepara la dilución de *Endotoxina control* o *de referencia* a una concentración de endotoxina igual a 2 λ. Cada solución debe realizarse por duplicado.

Interpretación - El ensayo sólo es válido cuando los controles negativos (-) y positivos (+) dan el resultado apropiado. La muestra cumple con el ensayo si el resultado de ambos duplicados de la muestra o dilución de ésta resulta negativo (-). No cumple si los duplicados resultan positivos (+). Repetir el ensayo si los duplicados no son coincidentes. Se puede repetir el ensayo hasta la MDV.

Ensayo Semicuantitativo

Si se desea obtener un resultado semicuantitativo, se realizan diluciones con concentraciones decrecientes, que correspondan a series geométricas donde el cociente de cada dilución con la inmediata siguiente es una constante. Preparar los controles positivos de la muestra con una dilución que no exceda la MDV y con el agregado de una concentración de endotoxina igual a 2 λ. Cada dilución de la muestra a ensayar debe hacerse al menos por duplicado, realizando en paralelo una serie duplicada de tubos

de reacción con diluciones de *Endotoxina control* o *de referencia* con concentraciones de 2,0 λ; 1,0 λ; 0,5 λ; 0 25 λ y los controles negativos de *Agua reactivo*. Calcular el contenido de endotoxina según se indica en *Cálculos*.

Interpretación - El ensayo sólo es válido cuando los controles negativos (-) y positivos (+) dan el resultado apropiado y la media geométrica en el punto final de la *Endotoxina control* o *de referencia* es mayor o igual a 0,5 λ, y menor o igual a 2 λ. La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxina es menor que la especificada en la monografía correspondiente.

Cálculos

Cálculo de la media geométrica - El punto final es la última dilución positiva en una serie de concentraciones decrecientes de endotoxina. Registrar la concentración en cada punto final, para cada serie de diluciones.

Determinar el logaritmo de la concentración del punto final (*e*) y calcular la media geométrica de la concentración del punto final por la fórmula siguiente:

$$anti\log\left(\sum e / f\right)$$

en la cual ∑*e* es la suma de los logaritmos de las concentraciones finales de la serie de diluciones y *f* es el número de tubos de reacción en el punto final.

Cálculo del contenido de endotoxina - Calcular la concentración de endotoxinas en el producto a ensayar, por la fórmula siguiente:

$$\lambda / anti\log\left(\sum d / f\right)$$

en la cual *d* es el logaritmo de los factores dilución del producto (expresados como fracciones), en el punto final para la muestra ensayada. [NOTA: los resultados finales deben ser expresados en las unidades de límite de endotoxina especificadas (UE/ml o UE/mg o UE/Ul)].

MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS: turbidimétrico y cromogénico

Método turbidimétrico - Mide el cambio de turbidez (por absorbancia o transmitancia) durante la transformación final de la proteína coagulante en coagulina. El valor de velocidad del cambio de turbidez es función de la concentración de endotoxina. Los ensayos deben ser realizados a la temperatura de incubación de 37 ± 1 °C.

Método cromogénico - Mide la concentración de un cromóforo liberado a partir de un péptido cromogénico contenido en una solución de endotoxina incubada con un lisado y un sustrato peptídico cromogénico (unido a *p*-nitroanilina), empleando un espectrofotómetro a la longitud de onda apropiada para la reacción. En casos de interferencia, se puede copular el cromóforo de *p*-nitroanilina por medio de una reacción de diazotación. Existen metodologías de punto final y cinéticas.

Método cromogénico de punto final

En este método se detiene la reacción enzimática, a un tiempo preseleccionado, con una cantidad apropiada de ácido acético. La concentración de endotoxina en la muestra o diluciones apropiadas de la misma se determina midiendo la absorbancia e interpolando la misma en una curva de calibración preparada con soluciones de *Endotoxina control* o *de referencia* en *Agua reactivo*. El pH de las soluciones debe estar comprendido en el intervalo especificado por el elaborador del reactivo. Los valores de pH deben estar comprendidos entre 6,0 y 8,0. Si fuera necesario, ajustar el pH antes del ensayo, mediante el agregado de ácido clorhídrico 0,1 N o hidróxido de sodio 0,1 N o soluciones reguladoras apropiadas, estériles y libres de endotoxinas.

Los criterios de validación de la curva de calibración, la verificación de ausencia de factores interferentes y la determinación de endotoxinas en las muestras son descriptos a continuación.

Validación de la curva de calibración - Debe realizarse cada vez que se emplee un nuevo lote de lisado o cuando se modifique alguna condición que pueda influir en el resultado del ensayo.

Preparar al menos cuatro series de soluciones de por lo menos cuatro concentraciones de *Endotoxina control* o *de referencia* en *Agua reactivo*, dentro del intervalo especificado por el elaborador. La curva debe incluir el límite (λ) especificado por el elaborador y un blanco de reactivos. Realizar el ensayo y graficar la absorbancia en función de la concentración de endotoxina para cada tubo. Efectuar una regresión de la curva de absorbancia en función de concentración. La recta de regresión debe tener una pendiente y linealidad significativas. El coeficiente de correlación /r/ debe ser ≥ 0,98 en valor absoluto en el intervalo de concentraciones de endotoxinas indicados por el elaborador del lisado.

Determinar la concentración de endotoxina, λm, a partir de la media aritmética de la concentración más alta (λa) y la concentración más baja (λb) para la cual la curva de regresión es lineal, siendo todos los valores expresados en UE/ml.

Factores interferentes - La muestra debe ser diluida de acuerdo a un factor de dilución calculado a partir de la fórmula siguiente:

Concentración de endotoxina límite/ λm

La concentración de endotoxina límite es igual a la endotoxina límite especificada o calculada, en UE/mg o UE/UI multiplicada por la concentración de la solución muestra, en mg o UI de producto por ml. Preparar al menos cuatro soluciones conteniendo *Endotoxina control* o *de referencia* a una concentración de λm.

Realizar el ensayo y calcular la media de la concentración de endotoxinas. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es mayor o igual a 50 % y menor a 200 % de λm, la muestra ensayada no contiene factores interferentes. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es menor a 50 % o mayor 200 %, los factores interferentes deben eliminarse según se indica en *Método de gel en tubo*.

Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es mayor a la concentración más alta en la parte lineal de la curva de regresión repetir el ensayo con un factor de dilución mayor de la muestra a ensayar, calculado por la fórmula siguiente:

Concentración de endotoxina límite/ λm'

en la cual λb < λm' < λm.

Procedimiento - Preparar las muestras, con las modificaciones apropiadas para eliminar factores interferentes y/o ajustar el pH, si fuera necesario.

En el protocolo de análisis deben prepararse las siguientes soluciones y ensayar cada solución por duplicado:

a) solución de la muestra a ensayar, en la dilución y condiciones que cumpla con el ensayo de interferencias;

b) solución de los controles positivos de la muestra por duplicado conteniendo *Endotoxina control* o *de referencia* a una concentración de λm o λm', en la misma dilución de la muestra a ensayar que en (*a*);

c) solución de *Endotoxina control* o *de referencia* en *Agua reactivo* a una concentración de λa, λb y de λm o λm´;

d) *Agua reactivo* como control negativo.

Emplear los volúmenes indicados de las soluciones descriptas, del lisado y del cromógeno (de acuerdo a la forma de lectura, en microplaca o microcubas) e incubar el tiempo especificado por el elaborador. Detener la reacción y medir la absorbancia a la longitud de onda apropiada para la reacción:

Para realizar la curva de calibración para el análisis de las muestras, proceder según se indica en *Validación de la curva de calibración*. Calcular la concentración de endotoxina de cada solución (*a*) y (*b*) empleando la regresión lineal obtenida con los controles (*c*).

El ensayo sólo es válido si se cumplen las siguientes condiciones:

- El resultado del control de *Agua reactivo* es negativo si no es mayor al límite del valor del blanco obtenido en *Validación de la curva de calibración*.
- El resultado de la solución control (*c*) cumple con los requisitos de *Validación de la curva de calibración*.
- La recuperación de endotoxina del control positivo no debe ser menor de 50 % ni mayor de 200 %, calculada por la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución (*b*) luego de sustraída la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución (*a*), calculando el porcentaje de recuperación dividiendo el resultado de la sustracción anterior por λm o λm' y multiplicando por 100.

El resultado de la muestra ensayada es aceptable si la concentración de endotoxina de cada uno de los duplicados es menor que λm o λm' en UE/ml. Si los resultados no son coincidentes, como por ej., si la concentración de una de las soluciones es más baja y la otra más alta que este límite, debe repetirse el ensayo. La muestra ensayada cumple con los requisitos del ensayo si ambas soluciones, en la repetición, cumplen con el límite del ensayo. Los resultados deben ser expresados en las unidades de endotoxinas límite especificadas (UE/mg, UE/ml o UE/UI).

Interpretación - La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxina es menor que la especificada en la monografía correspondiente.

METODOS CINETICOS:
turbidimétrico y cromogénico

Método turbidimétrico - Mide el tiempo de reacción necesario para el desarrollo de un grado predeterminado de turbidez de una solución sobre la cual se agrega lisado, empleando un aparato apropiado.

Método cromogénico - Mide el tiempo de reacción necesario para el desarrollo de una intensidad predeterminada de color después de la liberación de un péptido cromogénico, empleando un espectofotómetro a la longitud de onda apropiada.

En ambos métodos cinéticos, el logaritmo del tiempo de reacción guarda una relación lineal con el logaritmo de la concentración de endotoxina.

Los criterios de validación de la curva de calibración, la verificación de ausencia de factores interferentes y la determinación de endotoxinas en

las muestras a ensayar son descriptos a continuación.

Validación de la curva de calibración - Debe realizarse cada vez que se emplee un nuevo lote de lisado o cuando se modifique alguna condición que pueda influir en el resultado de ensayo.

Preparar al menos dos series de soluciones de por lo menos cuatro concentraciones de *Endotoxina control* o *de referencia* en *Agua reactivo*, dentro del intervalo requerido (no se recomienda emplear concentraciones más allá de los límites especificados por el elaborador). Emplear un control negativo de *Agua reactivo*. Agregar a cada tubo volúmenes iguales de lisado y, para el *Método cromogénico*, el volumen apropiado de péptido cromogénico. Medir el tiempo de reacción como se definió anteriormente. Graficar el logaritmo del tiempo de reacción en función del logaritmo de la concentración de cada tubo y efectuar un análisis de regresión de la curva correspondiente, empleando un método apropiado, como por ej., regresión lineal. La recta de regresión debe tener una pendiente y linealidad significativas. El coeficiente de correlación /r/ debe ser ≥ 0,98 en valor absoluto en el intervalo de concentraciones de endotoxinas especificado por el elaborador del lisado.

Determinar la cantidad de concentraciones equidistantes exponencialmente para las cuales la curva de regresión es lineal. Si ésta es 3 (λ1, λ2 y λ3), emplear la segunda concentración (λ2) como λm en el ensayo de factores interferentes y en el ensayo para determinación de endotoxinas en la muestra a ensayar. Si es igual a 4 ó 5, emplear la tercera concentración (λ3) como λm.

Factores interferentes - La muestra a ensayar debe ser diluida de acuerdo a un factor de dilución calculado a partir de la fórmula siguiente:

Concentración de endotoxina límite/ λm

La concentración de endotoxina límite es igual a la endotoxina límite especificada o calculada, en UE/mg o UE/UI multiplicada por la concentración de la solución, en mg o UI de producto por ml. Preparar al menos cuatro soluciones conteniendo *Endotoxina control* o *de referencia* a una concentración de λm.

El pH de las soluciones debe estar comprendido en el intervalo especificado por el elaborador. Este es generalmente entre 6,0 y 8,0.

Si fuera necesario ajustar el pH, antes del ensayo, por el agregado de ácido clorhídrico 0,1 N o hidróxido de sodio 0,1 N o soluciones reguladoras apropiadas, estériles y libres de endotoxinas.

Realizar el ensayo con estas cuatro soluciones y calcular la media de la concentración de endotoxinas como el antilogaritmo de la media logarítmica de concentración de endotoxinas. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es por lo menos el 50 % de λm, la muestra ensayada no contiene factores que puedan interferir con la actividad del lisado bajo las condiciones del ensayo; las muestras pueden entonces ser analizadas sin tratamiento previo para eliminar estas interferencias. Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es menor a 50 %, los factores interferentes deben ser eliminados según se indica en *Método de gel en tubo*.

Cuando la media de la concentración de endotoxina calculada es mayor a la concentración más alta en la parte lineal de la curva de regresión, repetir el ensayo con un factor de dilución mayor de la muestra a ensayar, calculado por la fórmula siguiente:

Concentración de endotoxina límite/ λm'

en la cual $\lambda b < \lambda m' < \lambda m$.

Procedimiento - Preparar las muestras, con las modificaciones apropiadas para eliminar factores interferentes y/o ajustar el pH, si fuera necesario.

En el protocolo de análisis deben prepararse las siguientes soluciones y ensayar cada solución por duplicado:

a) solución de las soluciones de la muestra a ensayar en la dilución que cumpla con el ensayo de interferencias;

b) solución de los controles positivos de la muestra, conteniendo *Endotoxina control* o *de referencia* a una concentración de λm o λm' en la misma dilución de la muestra a analizar que en (*a*).

c) solución de tres concentraciones logarítmicamente equidistantes de *Endotoxina control* o *de referencia* que cubran la parte lineal de la curva de regresión.

d) *Agua reactivo* como control negativo.

Para realizar la curva de calibración para el análisis de las muestras, proceder según se indica en *Validación de la curva de calibración*. Calcular la concentración de endotoxina de cada solución (*a*) y *(b)* empleando la regresión lineal generada por los controles *(c)*.

El ensayo es válido si se cumplen las siguientes condiciones:

- El resultado del control de *Agua reactivo* es negativo si no es mayor al límite del valor del blanco obtenido en *Validación de la curva de calibración*.
- El resultado de la solución control *(c)* cumple con los requisitos de *Validación de la curva de calibración*.
- La recuperación de endotoxina del control positivo no debe ser menor de

50 % ni mayor de 200 % de λm o λm', calculada por la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución *(b)* luego de sustraída la media aritmética de la concentración de endotoxina de la solución *(a)*, calculando el porcentaje de recuperación dividiendo el resultado de la sustracción anterior por λm o λm' y multiplicando por 100.

El resultado de la muestra ensayada es aceptable si la concentración de endotoxina de cada uno de los duplicados es menor que λm o λm' en UE/ml. Si los resultados no son coincidentes, como por ej., si la concentración de una de las soluciones es menor y la otra mayor que este límite, debe repetirse el ensayo. La muestra ensayada cumple con los requisitos del ensayo si ambas soluciones, en la repetición, cumplen con el límite del ensayo. Los resultados deben ser expresados en las unidades de endotoxinas límite especificadas (UE/mg, UE/ml o UE/UI).

Interpretación - La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la concentración de endotoxina es menor que la especificada en la monografía correspondiente.

335. ENSAYO DE MICOBACTERIAS

Ver *335. Ensayo de Micobacterias* en *Apartado de Vacunas* en *Volumen III.*

336. ENSAYO DE MICOPLASMAS

Ver *336. Ensayo de Micoplasmas* en *Apartado de Vacunas* en *Volumen III.*

339. ENSAYO DE NEUROVIRULENCIA PARA VACUNAS A VIRUS VIVO

Ver *339. Ensayo de Neurovirulencia para Vacunas a Virus vivo* en *Apartado de Vacunas* en *Volumen III.*

340. ENSAYO DE PIRETÓGENOS

El ensayo de piretógenos consiste en medir el aumento de la temperatura corporal en el conejo, provocado por la inyección intravenosa de una solución estéril del producto a ensayar.

Materiales y diluyentes - Emplear materiales y diluyentes estériles y libres de piretógenos. Se sugiere el calentamiento a 250 °C durante 30 minutos o 180 °C durante 3 horas, como método para despirogenar las jeringas de vidrio, agujas y el material de vidrio. Periódicamente se debe verificar ausencia de piretógenos en porciones representativas de los diluyentes y soluciones que se emplean para el lavado y enjuague de dispositivos.

Registro de la temperatura - Emplear un termómetro de mercurio o un dispositivo eléctrico capaz de medir la temperatura con una exactitud de ± 0,1 °C y que la lectura máxima se alcance en menos de 5 minutos. Introducir el dispositivo elegido en el recto del conejo a una profundidad no menor de 7,5 cm. El sensor debe permanecer en el recto durante todo el período de registro, se debe inmovilizar al conejo mediante un cepo holgado que le permita adoptar una postura natural. Cuando se emplea un termómetro de mercurio, dejar transcurrir el tiempo necesario (previamente determinado) para que se alcance la temperatura máxima, antes de proceder a la lectura.

Animales para el ensayo - Emplear conejos blancos, adultos, sanos, machos o hembras, cuyo peso no sea menor a 1,5 kg, alimentados con una dieta exenta de antibióticos y que no hayan perdido peso dentro de la semana previa al ensayo.

Alojamiento - Alojar los animales en un ambiente apropiado, a una temperatura uniforme entre 20 y 23 °C.

Ensayo preliminar para animales nuevos - Los animales que nunca hayan sido empleados para este ensayo deben someterse a un período de acostumbramiento y control previo. Para ello se colocarán en el cepo 2 horas diarias durante 2 semanas. Durante la segunda semana además se registrará su temperatura a los 60 y 120 minutos de colocados en el cepo. Finalmente se realizará un ensayo con Solución fisiológica libre de piretógenos (SR); no debiendo observarse aumentos de temperatura en cada animal superiores a 0,6 °C.

Selección de animales - Pueden emplearse conejos que hayan sido previamente utilizados cuando:

a) - ha transcurrido un período mayor de 3 días desde el último ensayo;

b) - ha transcurrido un período de por lo menos 14 días en caso que el animal haya presentado un aumento de temperatura de 0,6 °C o más durante el ensayo, o ha recibido un producto declarado piretogénico en un ensayo previo.

Procedimiento - Realizar el ensayo sobre un grupo de tres conejos del mismo sexo, en un área con condiciones ambientales similares al espacio donde están alojados habitualmente y que ésta no presente una variación de temperatura mayor a ± 2 °C. Los animales serán privados de alimento y agua desde la noche anterior hasta el final del ensayo.

Preparación e inyección de la muestra - La muestra puede disolverse o diluirse en Solución fisiológica (SR) estéril o en el líquido que se especifique en la monografía correspondiente. Calentar la solución a inyectar hasta alcanzar una temperatura de 37 ± 2 °C. Inyectar lentamente la solución en la vena marginal de la oreja del conejo durante un tiempo no mayor a 10 minutos a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. El volumen inyectado no debe ser mayor a 10 ml por kg de peso del animal.

Registro de las temperaturas inicial y máxima - La temperatura inicial de cada conejo es la media de dos valores medidos con un intervalo de 30 a 60 minutos previo á la inyección de la muestra: la temperatura máxima es la temperatura más alta registrada para ese mismo conejo en las 3 horas siguientes a la inyección. Se define la respuesta del animal como la diferencia entre la temperatura máxima y la temperatura inicial de cada conejo. Cuando esta diferencia es negativa el resultado se toma como cero.

Medir la temperatura de cada conejo a intervalos regulares de 30 minutos cono máximo, comenzando por lo menos 90 minutos antes de la inyección de la muestra y durante las 3 horas siguientes. Los conejos que presentan una variación de temperatura mayor a 0,2 °C entre dos lecturas sucesivas de las efectuadas para la determinación de la temperatura inicial no deben emplearse. Así como tampoco deben emplearse aquellos conejos cuyas temperaturas iniciales se desvían más de 1 °C con respecto a los restantes animales ni aquellos que tengan una temperatura inicial superior a 39,8 °C.

Interpretación de los resultados - El producto cumple con los requisitos del ensayo si ningún conejo presenta una respuesta con una variación

mayor o igual a 0,5 °C. Si uno o más de los tres conejos presenta un aumento de temperatura mayor a 0,5 °C se debe repetir el ensayo empleando cinco conejos adicionales. El producto cumple con los requisitos del ensayo si no más de tres de los ocho conejos presentan un aumento de temperatura mayor o igual a 0,5 °C y si la suma de los aumentos de temperatura de los ocho conejos no es mayor de 3,3 °C.

345. ENSAYO DE *SALMONELLA*/FRACCIÓN MICROSOMAL (TEST DE AMES) PARA DETECCIÓN DE MUTAGENICIDAD

El ensayo de Salmonella-fracción microsomal (o test de Ames) es una prueba *in vitro* que permite evaluar el potencial efecto mutagénico de compuestos químicos o productos biológicos como una medida indirecta del posible efecto carcinogénico sobre seres humanos. Esta prueba utiliza varias cepas de *Salmonella thyphimurium* auxótrofas para el aminoácido histidina que poseen distintas mutaciones en genes del operón histidina. Esas mutaciones son el blanco para mutágenos que producen daño al ADN por diferentes mecanismos. Cuando esas cepas de *Salmonella* se siembran sobre placas de medio mínimo-glucosa (placas MG) que contienen trazas de histidina, sólo pueden crecer en él las bacterias que revirtieron al fenotipo *his+*. El número de colonias revertantes por placa producidas en forma espontánea es relativamente constante para cada cepa. Por eso cuando se agrega un mutágeno a la placa, el número de colonias revertantes aumenta de manera dependiente de la dosis de dicho mutágeno.

Como las bacterias son incapaces de metabolizar productos químicos mediante citocromos P450, como los mamíferos y otros vertebrados, un componente clave del ensayo para hacerlo realmente útil es el agregado de un *Sistema exógeno de activación metabólica de mamífero*, se emplea habitualmente fracción microsomal de hígado de rata.

Cepas

Se utilizan las cepas de *Salmonella typhimurium* TA97a, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535 y TA 1538. Las mismas deberán ser provistas por un centro de referencia que certifique su autenticidad.

Estas se conservarán congeladas a -80 ºC (en freezer o en nitrógeno líquido). Su mantenimiento se realizará de acuerdo a lo aconsejado por el proveedor o lo acostumbrado por el laboratorio. Los cultivos congelados se prepararán a partir de cultivos frescos a los que se les agregará un agente crioprotector (por ejemplo Glicerol al 10 % v/v concentración final).

Cada cepa tiene una mutación en el operón histidina y otras mutaciones que aumentan su capacidad para detectar mutágenos. Los genotipos relevantes de las cepas se detallan en la *Tabla 1*.

Tabla 1

Cepa	Mutación operón histidina	Reversión	*bio ΔuvrB*	LPS	Plásmido
TA 97a	*hisD6610*	Corrimiento de armazón	Deleción	*rfa*	pKM101
TA 98	*hisD3052*	Corrimiento de armazón	Deleción	*rfa*	pKM101
TA 100	*his G46*	Sustitución	Deleción	*rfa*	pKM101
TA 102	*hisG428*	Transición /transversión	Tipo salvaje	*rfa*	pKM101, pAQ1
TA 1535	*his G46*	Sustitución	Deleción	*rfa*	-
TA 1538	*hisD3052*	Corrimiento de armazón	Deleción	*rfa*	-

bioΔuvrB: la mutación por deleción de *uvrB* elimina el sistema de reparación de ADN por escisión. Eso aumenta la mutabilidad de la bacteria y la hace sensible a la irradiación con luz UV. La deleción abarca también el gen para biotina lo que hace que la bacteria sea dependiente de biotina.

rfa: esta mutación produce una síntesis defectuosa del lipopolisacárido (LPS) de pared lo que aumenta la permeabilidad de la bacteria para compuestos voluminosos. La bacteria se vuelve sensible al colorante Cristal Violeta.

Plásmido pKM101: aumenta la mutagénesis química e inducida por UV mediante un aumento de la ruta de reparación por recombinación, propensa a error. El plásmido confiere resistencia a ampicilina.

Plásmido pAQ1: este plásmido multicopia lleva la mutación *hisG428*. Eso amplifica el número de sitios para la acción del mutágeno con el consiguiente aumento de reversión de la cepa portadora. El plásmido confiere resistencia a tetraciclina.

Soluciones y medios de cultivo

Soluciones

Cada ensayo debe realizarse con una misma partida de reactivos, soluciones, medios y agar.

Preparación de soluciones

A menos que se indique de otro modo las soluciones y los medios se esterilizarán en autoclave. El tiempo total de tratamiento, a 121 ºC, dependerá del volumen total a esterilizar.

I. Solución de glucosa al 10 %

D-glucosa (Dextrosa).....100 g
Agua destilada c.s.p.....1 litro

Agregar la *D*-glucosa a 700 ml de agua. Mezclar hasta que la solución sea límpida. Completar a volumen con agua destilada. Fraccionar en volúmenes superiores a 20 ml. Autoclavar. Conservar en heladera.

II. Solución de biotina al 0,01 %

D-biotina.....10 mg
Agua destilada.....100 ml

Calentar el agua (aproximadamente a 40 °C) y disolver la *D*-biotina. Esterilizar por filtración a través de membrana filtrante de 0,22 µm. Conservar en heladera.

III. Solución de histidina al 0,5 %

L-histidina . HCl . H_2O.....500 mg
Agua destilada.....100 ml

Disolver la histidina en el agua destilada. Autoclavar y conservar en heladera.

IV. Solución de histidina/biotina 0,5 mM

D-biotina.....124 mg
L-histidina . HCl . H_2O.....96 mg
Agua destilada.....1 litro

Calentar el agua (aproximadamente a 40 °C) y disolver la *D*-biotina y la histidina. Esterilizar por filtración a través de membrana filtrante de 0,22 µm. Conservar en heladera.

V. Solución reguladora de fosfato de sodio 0,2 M pH 7,4

NaH_2PO_4…….....24 g
Na_2HPO_4 . $2H_2O$…….……...35,6 g
Agua destilada c.s.p……..……..1 litro

Disolver las sales en un volumen reducido de agua y luego completar a volumen final. Ajustar el pH a 7,4 ± 0,2. Esterilizar en autoclave. Conservar en heladera.

VI. Cofactores para la mezcla S9

D-glucosa-6-fosfato.....1,6 g
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP)…….3,5 g
Cloruro de magnesio.....1,8 g
Cloruro de potasio.....2,7 g
Fosfato dibásico de sodio….....12,8 g
Fosfato monobásico de sodio.....2,8 g
Agua destilada c.s.p.....1 litro

Agregar a 900 ml de agua los ingredientes uno a uno, disolviendo por completo cada uno antes de agregar el siguiente. Completar a volumen con agua. Esterilizar por filtración a través de membrana filtrante de 0,22 µm. Conservar a -20 °C.

VII. Solución de ampicilina al 0,8 %

Ampicilina.....800 mg
Agua destilada.....100 ml

Disolver la ampicilina en el agua caliente (aproximadamente 40 °C). Esterilizar por filtración a través de membrana filtrante de 0,22 µm. Conservar en heladera.

VIII. Solución de tetraciclina al 0,8 %

Tetraciclina.....800 mg
Agua destilada:Etanol (1:1).....100 ml

Disolver la tetraciclina en la mezcla de agua destilada:etanol (1:1). Esterilizar por filtración a través de membrana filtrante de 0,22 µm. Conservar en envase inactínico en heladera.

IX. Solución de cristal violeta al 0,1 %

Cristal violeta.....100 mg
Agua destilada.....100 ml

Disolver el cristal violeta en el agua. Conservar en envase inactínico en heladera.

X. Soluciones madres de mutágenos control

Solución de 2-aminoantraceno: 25 mg por ml en dimetil sulfóxido.

Solución de Azida sódica: 10,0 mg por ml en agua destilada.

Solución de 9-aminoacridina: 10 mg por ml en dimetil sulfóxido.

Solución de Nitrofurantoína: 20 mg por ml en dimetil sulfóxido.

Solución de Mitomicina C: 1 mg por ml en agua destilada.

Solución de 4-Nitroquinolina-*N*-óxido: 20 mg por ml en dimetil sulfóxido.

Se pueden emplear otros mutágenos de probada acción sobre la cepa de interés.

Las soluciones madres de los mutágenos deben ser preparadas extremando las medidas de seguridad dado la peligrosidad de las sustancias que se manipulan. Trabajar solamente bajo campana de

seguridad biológica y con la protección adecuada.

En cada caso pesar la cantidad de droga necesaria por diferencia en el recipiente en el cual se preparará la solución, preferentemente frascos de vidrio inactínico, estériles, agregar el volumen de solvente estéril necesario y disolver. No filtrar.

Las soluciones madres de los mutágenos se conservan a –20 °C y se diluyen a las concentraciones de trabajo en el día del ensayo.

Preparación de medios de cultivo y placas

I. Medio E (50x) (sales VB ó Vogel-Bonner)

Sulfato de magnesio heptahidrato.....10 g
Ácido cítrico monohidrato .....100 g
Fosfato dibásico de potasio anhidro .....500 g
Fosfato de sodio y amonio tetrahidrato.....175 g
Agua destilada c.s.p.....1 litro

Agregar los ingredientes a 650 ml de agua caliente (aproximadamente a 50 °C) en el orden indicado y mezclar con agitador magnético hasta disolución total antes del agregado del componente siguiente. Completar a volumen con agua. Fraccionar, esterilizar a 121 °C en autoclave durante 15 minutos. Conservar en envases inactínicos a temperatura ambiente.

II. Agar blando suplementado con histidina/biotina

Agar.....6 g
Cloruro de sodio.....6 g
Solución de histidina/biotina 0,5 mM.....100 ml
Agua destilada c.s.p.....1 litro

Autoclavar el agua con el agar y el cloruro de sodio, a 121°C durante 15 minutos. Conservar en envases inactínicos a temperatura ambiente. En el momento de usar fundir el medio preparado en microondas o en agua hirviente y agregar la *Solución estéril de histidina/biotina 0,5 mM*.

III. Caldo nutritivo

Seguir las instrucciones del fabricante que figuran en el envase.

IV. Placas de agar nutritivo

Seguir las instrucciones del fabricante que figuran en el envase. Luego de la esterilización dejar entibiar y volcar en placas de Petri de plástico estériles.

V. Placas de medio mínimo-glucosa (MG)

Agar.....15 g
Medio E (50x).....20 ml
Solución de glucosa al 10 %.....50 ml
Agua destilada c.s.p.....1 litro

Agregar el agar al agua y autoclavar a 121 °C durante 30 minutos. Dejar enfriar hasta alrededor de 60 °C. Agregar el *Medio E (50x)* y la *Solución de glucosa al 10 %*, previamente esterilizados, mezclar cuidadosamente y volcar en placas de Petri de plástico estériles.

VI. Placas de medio mínimo-glucosa (MG) enriquecidas

[NOTA: estas placa serán empleadas para el aislamiento y la caracterización fenotípica de las cepas de manera que en todos los casos deben contener histidina en exceso (para su preparación se emplea *Solución de histidina al 0,5 %*), a diferencia de las placas que se emplean para la realización del ensayo que sólo contendrán trazas de histidina para permitir sólo unas pocas divisiones de las cepas *his* -]

Para preparar 1 litro de medio mínimo – glucosa enriquecido agregar los siguientes volúmenes a 1 litro del medio agarizado preparado en *V. Placas de medio mínimo-glucosa (MG)*:

Placas MG-biotina
Solución de biotina al 0,01 %.....8 ml

Placas MG-histidina
Solución de histidina al 0,5 %.....8 ml

Placas MG-biotina/histidina
Solución de biotina al 0,01 %……...8 ml
Solución de histidina 0,5 %.....8 ml

Placas MG-biotina/histidina/Ampicilina
Solución de biotina al 0,01 %.....8 ml
Solución de histidina al 0,5 %.....8 ml
Solución de ampicilina al 0,8 %.....3 ml
(concentración final 24 µg por ml)

Placas MG-biotina/histidina/Ampicilina/ Tetraciclina
Solución de biotina al 0,01 %.....8 ml
Solución de histidina al 0,5 %.....8 ml
Solución de ampicilina al 0,8 %.....3 ml
(concentración final 24 µg por ml)
Solución de tetraciclina al 0,8 %.....0,25 ml
(concentración final 2 µg por ml)

Recuperación de las cepas para su caracterización fenotípica y para la realización del ensayo

Para cada ensayo las cepas de *Salmonella* se recuperan tomando una alícuota del cultivo congelado y transfiriéndola a caldos nutritivos (con el agregado de antibiótico en los casos que corresponda para evitar la pérdida de los plásmidos) de manera de obtener una densidad inicial aproximada de células de entre 10^6 y 10^7 UFC por ml. Los caldos se incuban con agitación suave

entre 11 y 14 hs a 37 °C hasta una densidad de 1-2 × 10^9 UFC/ml (fase exponencial de crecimiento o comienzo de fase estacionaria). Se sugiere realizar un recuento en placa, mediante diluciones seriadas, para confirmar el número de bacterias viables. Concluida la incubación los caldos se mantienen a temperatura ambiente protegidos de la exposición a la luz fluorescente. De ahora en adelante estos caldos serán denominados *Cultivos de trabajo*.

[NOTA: el resto del cultivo congelado no se reutiliza.]

Caracterización fenotípica de las cepas de *Salmonella typhimurium* utilizadas para la realización del ensayo

A continuación se describen los ensayos a realizar con las cepas de *Salmonella typhimurium* que se utilizarán para la realización del ensayo con el propósito de confirmar la identidad genética de las mismas y su tasa de reversión espontánea al carácter *his*+.

Estos ensayos deben ser realizados cuando se preparen cultivos de las cepas para ser congelados y antes de la realización del Ensayo de *Salmonella*/Fracción microsomal (Test de Ames) para la detección de mutagenicidad de compuestos químicos y productos biológicos.

Procedimiento

Los ensayos se realizan con cultivos de toda la noche en caldo nutritivo (*cultivos de trabajo*).

a) Dependencia de histidina (*his*)

Se realiza un aislamiento del cultivo en una *Placa MG-biotina*. Como todas las cepas utilizadas de *Salmonella* son dependientes de histidina, no debe observarse crecimiento luego de 48 horas de incubación a 37 ºC.

b) Dependencia de biotina (*bio*)

Se realiza un aislamiento del cultivo en una *Placa MG-histidina*. No debe observarse crecimiento, excepto con la cepa TA102 que es independiente de biotina luego de 48 hs de incubación a 37 ºC.

c) Dependencia de biotina e histidina (*bio, his*)

Se realiza un aislamiento del cultivo en una *Placa MG-biotina/histidina*. Debe observarse crecimiento con todas las cepas luego de 24-48 hs de incubación a 37 ºC..

d) Marcador *rfa*

Se realiza un aislamiento del cultivo en una *Placa MG-biotina/histidina*, o en una placa de agar nutritivo. Se coloca un disco de papel de filtro estéril en el centro de la siembra y se aplican sobre él, 10 µl de solución de cristal violeta al 0,1 %. Todas las cepas deben mostrar una zona de inhibición de crecimiento alrededor del disco después de 24 horas de incubación a 37 ºC.

e) Deleción *uvrB*

Se realiza un aislamiento del cultivo en una *Placa MG-biotina/histidina* o en una placa de agar nutritivo. Se irradia la placa con luz UV(C) durante un período de tiempo previamente estandarizado, se envuelve en papel de aluminio para evitar la fotorreparación en contacto con la luz y se incuba a 37 °C. Excepto la cepa TA102 el resto de las cepas de *Salmonella* no crecen después de la irradiación.

f) Presencia del plásmido pKM101 (resistencia a ampicilina)

Se realiza un aislamiento del cultivo en una *Placa MG-biotina/histidina/Ampicilina* o en una placa de agar nutritivo con ampicilina (24 µg por ml). Se incuba a 37 ºC y debe observarse crecimiento sólo con las cepas portadoras del plásmido pKM101.

g) Presencia del plásmido pAQ1 (resistencia a tetraciclina)

Se hace un aislamiento del cultivo en una *Placa MG-biotina/histidina/Ampicilina/Tetraciclina* o en una placa de agar nutritivo con tetraciclina (2 µg por ml). Se incuba a 37 ºC y debe observarse crecimiento sólo con la cepa TA102 que es la única portadora del plásmido pAQ1.

[NOTA: Las pruebas anteriores pueden realizarse también haciendo una pequeña descarga horizontal del cultivo en la placa que corresponda en lugar de un aislamiento, lo que permite utilizar una sola placa de cada tipo para evaluar varios clones por placa.]

h) Frecuencia de mutación espontánea

Para determinar la frecuencia de mutación espontánea de las cepas de *Salmonella* se emplea el método de incorporación en placa (ver más adelante). Los valores de reversión espontánea deben encontrarse dentro del rango de valores histórico del laboratorio para cada cepa o del informado por el proveedor.

Ensayo de Salmonella/Fracción microsomal (Test de Ames) para detección de mutagenicidad

En esta sección se describirá la realización del Ensayo de *Salmonella*/Fracción microsomal (Test de Ames) para la detección de mutagenicidad de compuestos químicos y productos biológicos.

Preparación de la muestra

Solventes

Se utilizará preferentemente agua destilada

estéril. Si la muestra a probar no es soluble en agua se utilizará dimetil sulfóxido.

Si se emplea otro solvente se realizará un ensayo preliminar de toxicidad del mismo para determinar la concentración máxima que no afecte el crecimiento y supervivencia bacterianos.

Determinación preliminar de la toxicidad de la muestra en estudio

Para esta etapa se empleará el procedimiento de incorporación en placa del Test de Ames que se describe más adelante.

Se realizará un ensayo preliminar de toxicidad para determinar la dosis máxima de la muestra que puede emplearse en el ensayo de mutagenicidad.

Esta prueba se realizará en ausencia y presencia de la mezcla de activación metabólica y deberán incluirse un control positivo y uno de solvente. Se probarán al menos tres concentraciones de la solución (acuosa u orgánica) de la muestra.

El ensayo de toxicidad puede llevarse a cabo con una sola cepa (TA100 o TA98, o las cepas que se emplearán en el ensayo definitivo).

La cepa se pondrá en presencia de su mutágeno específico (por ej. 2-nitro fluoreno para TA98) y se observará la disminución en el recuento de revertantes como resultado de la inhibición de crecimiento por la muestra.

Se empleará la menor dilución de la muestra que no inhiba el crecimiento bacteriano para la realización del ensayo definitivo.

En el caso de productos no tóxicos se propone una dosis máxima entre 5 y 10 mg por placa siempre que la solubilidad de los mismos lo permita.

Procedimientos

Ensayo de incorporación en placa

En este ensayo se exponen directamente las cepas de *Salmonella* a la acción de la muestra a probar sobre *Placas de medio mínimo-glucosa (MG)* en presencia y ausencia de un sistema exógeno de activación metabólica.

Procedimiento experimental

1) Preparar los cultivos de trabajo según lo descripto anteriormente.

2) Rotular las *Placas de medio mínimo-glucosa (MG)* y los tubos de vidrio estériles de 13 × 100 mm.

3) Preparar el sistema exógeno de activación metabólica y mantenerlo sobre hielo hasta el momento de su uso.

4) Preparar las diluciones de la muestra a ser probadas. Se propone un mínimo de cinco diluciones de la muestra en estudio, que cubran un rango de tres órdenes de magnitud.

5) Fundir el *Agar blando suplementado con histidina/biotina* y mantenerlo entre 43 y 45 ºC.

6) Agregar a los tubos de vidrio estériles mantenidos entre 43 y 45 ºC, en el orden siguiente y mezclando después de cada agregado:

- Entre 2 y 3 ml de *Agar blando suplementado con histidina/biotina*.
- 0,50 ml de la mezcla de activación metabólica (mezcla S9) o de *Solución reguladora de fosfato de sodio 0,2 M pH 7,4*
- 0,05 ml de la muestra en ensayo
- 0,1 ml del cultivo de trabajo de la cepa de *Salmonella* (entre 1 y 2 × 10^8 UFC por tubo).

7) Volcar el contenido de cada tubo en una placa de agar *MG* y dejar solidificar el agar blando a temperatura ambiente.

8) Invertir las placas y colocarlas en la estufa de cultivo a 37 ºC durante 48 horas.

9) Contar las colonias revertantes aparecidas en cada placa.

Sembrar cada condición por triplicado.

Ensayo de preincubación

En esta variante del método se preincuba la solución de la muestra con la cepa (aproximadamente 10^8 UFC por tubo) en presencia y ausencia del sistema de activación metabólica durante 20 a 30 minutos a 37 ºC antes de mezclar con el agar blando (adicionado de biotina y trazas de histidina) y volcarlo sobre la superficie de la placa de medio mínimo con glucosa.

Los tubos deben ser preincubados con agitación.

Procedimiento experimental

1) Preparar los cultivos de trabajo según lo descripto anteriormente.

2) Rotular las placas *MG* y los tubos de vidrio estériles de 13 × 100 mm.

3) Preparar el sistema de activación metabólica y mantenerlo sobre hielo hasta el momento de usar.

4) Preparar las diluciones de la muestra a ser probada. Se propone un mínimo de cinco diluciones de la muestra en estudio, que cubran un rango de tres órdenes de magnitud.

5) Fundir el agar blando (AB) conteniendo 0,05 mM histidina y 0,05 mM biotina y mantenerlo entre 43 y 45 ºC.

6) Agregar a los tubos de vidrio estériles mantenidos a 43 y 45 ºC, en el orden siguiente y mezclando después de cada agregado:

- 0,50 ml de la mezcla de activación metabólica (mezcla S9) o de *Solución reguladora de fosfato de sodio 0,2 M pH 7,4*
- 0,05 ml (o 0,1 ml) de la muestra a probar
- 0,1 ml del cultivo de trabajo de la cepa de *Salmonella* (entre 1 y 2 × 10^8 UFC por tubo)

7) Incubar los tubos en baño con agitación a

37 °C durante 20-30 minutos. Concluida la incubación agregar a cada tubo entre 2 y 3 ml de *Agar blando suplementado con histidina/biotina*.

8) Volcar el contenido de cada tubo en una placa de agar *MG* y dejar solidificar el agar blando a temperatura ambiente.

9) Invertir las placas y colocarlas en la estufa de cultivo a 37 ºC durante 48 horas.

10) Contar las colonias revertantes aparecidas en cada placa.

Sembrar cada condición por triplicado.

Controles positivos y negativos

En todas las pruebas deben incluirse controles positivos y negativos.

El *control negativo* es el solvente empleado para solubilizar y diluir la muestra en estudio y deberá ser probado en ausencia y presencia del sistema exógeno de activación metabólica.

Los *controles positivos* se emplean en las cantidades por placa que se indican a continuación:

Tabla 2. Control positivo (con activación metabólica)

Cepa	*Cantidad de mutágeno por placa*
TA97a, TA98 y TA100	2,5 µg de 2-Amino antraceno
TA102	5 µg de 2-Amino antraceno

En el caso del 2-Amino antraceno es necesario ensayar en ausencia y presencia del sistema exógeno de activación metabólica ya que adquiere actividad mutagénica al ser metabolizado.

Tabla 3. Control positivo (sin activación metabólica)

Cepa	*Cantidad de mutágeno por placa*
TA97a	50 µg de 9-Aminoacridina (clorhidrato.hidrato)
TA98 y TA1538	5 µg de Nitrofurantoína
TA100 y TA1535	5 µg de Azida sódica
TA102	0.5 µg de Mitomicina C

Los mutágenos que figuran en esta tabla tienen actividad mutagénica *per se*.
Se pueden emplear otros mutágenos de probada acción sobre la cepa de interés.

Sistema exógeno de activación metabólica

El sistema de activación metabólica utilizado habitualmente consiste en el sobrenadante de la fracción obtenida a 9.000 G con un homogenato de hígado de rata (fracción microsomal S-9) que ha sido previamente inducida con una mezcla de bifenilos policlorados de las que se encuentran comercialmente disponibles, o con una mezcla de fenobarbital y *β*-naftoflavona. Una vez obtenida la fracción microsomal S-9, se fracciona y se conserva a -80 ºC.

Mezcla S-9

En el momento de emplearlos se descongela un volumen de S-9 de acuerdo a las necesidades del ensayo y el volumen equivalente de mezcla de cofactores (ver soluciones y medios). Se prepara la mezcla S9: habitualmente se emplean concentraciones entre 5 y 30 % v/v de fracción microsomal en solución de cofactores. La elección dependerá del tipo de producto a ensayar.

Registro de los resultados

Se completará una planilla por cada una de las cepas empleadas, con y sin activación metabólica. En las mismas deben figurar los resultados de las lecturas de cada una de las tres placas, el promedio y el desvío estándar en las cinco concentraciones de muestra y en los controles.

Evaluación de los resultados

Los datos se evalúan según los siguientes criterios:

Una muestra se considera *Positiva* (mutagénica) si el número promedio de revertantes con cualquiera de las cepas y en cualquiera de las concentraciones probadas es al menos dos veces mayor que el número de revertantes detectadas en el control negativo y se observa un incremento relacionado con la concentración en las revertantes por placa con la misma cepa.

Una muestra se considera *Negativa* (no mutagénica) si no hay ninguna concentración a la que produzca un número promedio de revertantes por placa superior por lo menos en dos veces al número de revertantes detectadas en el control negativo y no muestra un incremento de revertantes relacionado con la concentración.

350. ENSAYOS DE SUSTANCIAS FÁCILMENTE CARBONIZABLES

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, agregar la cantidad de muestra en pequeñas porciones a un tubo de Nessler de vidrio incoloro, neutro, resistente al ácido sulfúrico y que contenga el volumen especificado de ácido sulfúrico (SR) (ver *Reactivos y Soluciones*).

Agitar la mezcla con una varilla de vidrio hasta disolución completa. Dejar la solución en reposo durante 15 minutos, a menos que se especifique de otro modo y comparar el color de la solución muestra con el de la solución de comparación especificada en la monografía correspondiente (ver *Tabla*), contenida en un tubo de Nessler igual al anterior. Examinar las soluciones transversalmente contra un fondo blanco.

Cuando se indica que se debe calentar para lograr la disolución de la muestra en ácido sulfúrico (SR), mezclar ambos en un tubo de ensayo, calentar como se indica y transferir la solución al tubo de Nessler.

Preparación de las soluciones de comparación - Medir exactamente los volúmenes de las soluciones colorimétricas (SC) (ver *Soluciones colorimétricas* en *Reactivos y Soluciones*) y de agua indicados en la *Tabla*. Transferir la solución resultante a un tubo de Nessler y mezclar.

Tabla.

Soluciones de comparación	Partes de cloruro cobaltoso (SC)	Partes de cloruro férrico (SC)	Partes de sulfato cúprico (SC)	Partes de agua
A	0,1	0,4	0,1	4,4
B	0,3	0,9	0,3	3,5
C	0,1	0,6	0,1	4,2
D	0,3	0,6	0,4	3,7
E	0,4	1,2	0,3	3,1
F	0,3	1,2	0,0	3,5
G	0,5	1,2	0,2	3,1
H	0,2	1,5	0,0	3,3
I	0,4	2,2	0,1	2,3
J	0,4	3,5	0,1	1,0
K	0,5	4,5	0,0	0,0
L	0,8	3,8	0,1	0,3
M	0,1	2,0	0,1	2,8
N	0,0	4,9	0,1	0,0
O	0,1	4,8	0,1	0,0
P	0,2	0,4	0,1	4,3
Q	0,2	0,3	0,1	4,4
R	0,3	0,4	0,2	4,1
S	0,2	0,1	0,0	4,7
T	0,5	0,5	0,4	3,6

Actualización parcial

360. ENSAYO DE TOXICIDAD ANORMAL

El siguiente ensayo se emplea para determinar una reactividad biológica inaceptable o inesperada en productos farmacéuticos. Para productos de origen biológico realizar el ensayo según se indica en *Productos biológicos*.

Procedimiento - Seleccionar cinco ratones sanos que pesen 20 ± 3 g y que no hayan sido empleados en ningún ensayo previo.

Preparar la solución muestra según se especifica en la monografía correspondiente e inyectar a cada ratón 0,5 ml de la misma por vía intravenosa.

Observar los animales durante las 48 horas posteriores a la inyección. Si al cabo de 48 horas todos los animales sobreviven y no más de uno presenta signos externos de una reacción inesperada para el nivel de toxicidad del producto, el mismo cumple con los requisitos del ensayo. Si uno de los animales muere o si más de uno presenta signos de toxicidad anormal, repetir el ensayo empleando al menos diez ratones similares a los del ensayo original que pesen 20 ± 1 g. El producto cumple con los requisitos del ensayo si a las 48 horas todos los ratones sobreviven y no presentan signos de toxicidad anormal.

Productos biológicos - Este ensayo no está indicado para productos. como sangre entera, glóbulos rojos, plaquetas o plasma.

Animales - Seleccionar no menos de dos cobayos que pesen 400 ± 40 g y no menos de dos ratones que pesen 22 ± 2 g, que no hayan sido empleados en ningún ensayo previo.

Procedimiento - La duración del ensayo será de 7 días para cada especie, a menos que se especifique un período más largo en la monografía correspondiente. Cada animal debe ser pesado antes de la primera inyección y al finalizar el ensayo, registrando los pesos individualmente. La observación de los animales debe realizarse diariamente.

Los productos deben ser administrados como se detalla a continuación:

Productos líquidos o liofilizados a ser reconstituidos según se indica en el rótulo - Inyectar por vía intraperitoneal 0,5 ml del producto en cada ratón y 5 ml del producto en cada cobayo.

Productos liofilizados sin indicación de volumen de reconstitución en el rótulo y productos sólidos no liofilizados - Inyectar por vía intraperitoneal una dosis humana que no supere 1 ml a los ratones y 5 ml a los cobayos.

Interpretación de los resultados - El producto cumple con los requisitos si todos los animales sobreviven al ensayo, no presentan respuestas inesperadas al producto y el peso de los animales al finalizar el período de ensayo no es menor al que tenían al comienzo del mismo.

Si el producto no cumple con los requisitos del ensayo, repetir según se indica en *Procedimiento* empleando las especies de animales en las cuales no se cumplieron los requisitos originales. El producto cumple con los requisitos del ensayo, si los animales satisfacen el criterio especificado para el ensayo original. Si el producto no cumple con los requisitos y si han sobrevivido por lo menos el 50% de los animales (incluyendo el ensayo original y la repetición), repetir nuevamente con el doble de animales de las especies que no cumplieron los requisitos. El producto cumple los requisitos del ensayo si los animales satisfacen el criterio especificado en el ensayo original.

370. ENSAYOS DE ESTERILIDAD

El siguiente ensayo se emplea para verificar la ausencia de contaminación por microorganismos en productos esterilizados o pr eparados asépticamente. Durante el desarrollo del ensayo, el área de trabajo no debe estar expuesta a la luz ultravioleta directa ni sometida a o tros agentes esterilizantes. Deben realizarse monitoreos microbiológicos del área durante los ensayos.

La ausencia de contaminación microbiana, evidenciada por este procedimiento, confirma que el producto cumple con los requisitos del ensayo aunque el mismo no es suficiente para suponer la esterilidad de la totalidad del lote ensayado, dadas las limitaciones inherentes a la estadística del muestreo. La condición de estéril se asegura a través de la validación del proceso de esterilización o del procesamiento aséptico.

El ensayo debe realizarse en un área de al menos igual clase que la empleada para el procesamiento aséptico.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se preparan de acuerdo a las siguientes fórmulas. También se pueden emplear fórmulas deshidratadas que luego de reconstituidas cumplan con el *Ensayo de promoción del crecimiento* y el *Ensayo de esterilidad de los medios de cultivo*.

Medio Tioglicolato

(Para incubación en condiciones aeróbicas)

L-Cistina ……..……..	0,50 g
Agar (con menos de 15 % de humedad)	0,75 g
Cloruro de sodio ……...	2,50 g
Glucosa Monohidrato ……...	5,50 g
Extracto de levadura (soluble en agua)	5,00 g
Digerido pancreático de caseína ……...	15,0 g
Tioglicolato de sodio * …….	0,50 g
Solución de resazurina sódica (0,1 %) recién preparada……..……..	1,00 ml
Agua purificada c.s.p. ……..	1.000 ml

pH después de la esterilización: 7,1 ± 0,2.

*En caso de reemplazarse por Acido tioglicólico emplear 0,3 ml.

Mezclar y calentar hasta disolución completa.

Ajustar el pH del medio con hidróxido de sodio 1 N para obtener, después de la esterilización, un pH de 7,1 ± 0,2. Filtrar en caliente, si fuera necesario, a través de un papel de filtro humedecido. Distribuir el medio en recipientes de vidrio que mantengan una relación entre la superficie expuesta y la profundidad de medio tal que no más de la mitad superior experimente un cambio de color, indicativo de la fijación de oxígeno, al final del período de incubación. Tapar para evitar la contaminación y la evaporación excesiva del medio durante el almacenamiento. Esterilizar empleando un procedimiento validado. Enfriar inmediatamente a 25 °C. Si más del tercio superior ha tomado una coloración rosada, el medio podrá regenerarse una sola vez, calentando los recipientes en un baño de agua o con vapor fluente, hasta que desaparezca el color. Cuando el medio está listo para emplear, no más del décimo superior debe tener un color rosado.

Caldo Tioglicolato Alternativo

(Para incubación en condiciones anaeróbicas)

L-Cisteína ……..	0,50 g
Cloruro de sodio ……	2,50 g
Glucosa monohidrato ……	5,50 g
Extracto de levadura (soluble en agua) ……..	5,00 g
Digerido pancreático de caseína ……	15,0 g
Tioglicolato de sodio*…….….	0,50 g
Agua purificada c.s.p. ……	1.000 ml

pH después de la esterilización: 7,1 ± 0,2.

*En caso de reemplazarse por Acido tioglicólico emplear 0,3 ml

Disolver los componentes sólidos en el agua, calentando suavemente, si fuera necesario, hasta obtener una solución. Ajustar la solución con hidróxido de sodio 1 N para obtener, después de la esterilización, un pH de 7,1 ± 0,2. Filtrar, si fuera necesario, transferir a r ecipientes apropiados y esterilizar empleando un procedimiento validado. El medio debe ser recientemente preparado o calentado en un baño de vapor y enfriado rápidamente antes de su empleo. No se debe recalentar.

Caldo Digerido de Caseína-Soja

(Para incubación en condiciones aeróbicas)

Digerido pancreático de caseína ……	17,0 g
Digerido papaínico de harina de soja …….	3,00 g
Glucosa monohidrato …….	2,50 g
Fosfato dibásico de potasio ……	2,50 g
Cloruro de sodio …….	5,00 g
Agua purificada c.s.p. …….	1000 ml

pH después de la, esterilización: 7,3 ±

Disolver los componentes sólidos en el agua, calentando suavemente. Enfriar la solución a temperatura ambiente y ajustar con hidróxido de sodio 1 N para obtener, después de la esterilización, un pH de 7,3 ± 0,2. Filtrar, si fuera necesario, y envasar en recipientes apropiados. Esterilizar empleando un procedimiento validado.

Medios para penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y monobactámicos

Cuando se empleen Medio Tioglicolato y Caldo Digerido de Caseína-Soja en el *Método de transferencia directa* para penicilinas o cefalosporinas, suplementarlos mediante el agregado en forma aséptica de cantidad suficiente de una beta-lactamasa apropiada para inactivar totalmente la cantidad de antibiótico presente en la muestra.

Cuando se emplee el *Método por filtración*, también puede ser necesario el agregado de una beta-lactamasa apropiada a los medios de cultivo y/o a las soluciones de enjuague.

La cantidad y/o tiempo de contacto deben ser establecidas mediante la validación del procedimiento.

Esterilidad de los medios de cultivo

Verificar la esterilidad de cada lote incubando una muestra del mismo a l a temperatura correspondiente a cad a medio, durante 14 días o incubando un recipiente con medio no inoculado como control negativo en paralelo al ensayo de esterilidad.

Ensayo de promoción del crecimiento

Examinar cada lote para determinar su capacidad de promover el crecimiento microbiano a través de su inoculación en envases separados, con no más de 100 microorganismos viables de cada una de las cepas descriptas en la *Tabla 1* e incubando en las condiciones especificadas.

Los medios de cultivo son aceptables si existen evidencias de crecimiento en todos los envases inoculados dentro de los 3 días de incubación para bacterias y 5 días para hongos y levaduras. El ensayo de esterilidad no es válido si el medio de cultivo presenta una respuesta inapropiada al crecimiento microbiano.

Almacenamiento

Si los medios se almacenan en envases sellados pueden ser empleados durante no más de 1 año, pero se deben llevar a cabo los ensayos de promoción del crecimiento cada 3 meses, y confirmar si cumplen con los requisitos correspondientes al color del indicador.

Si los medios se almacenan en recipientes no sellados, pueden conservarse hasta 1 mes a menos que se haya validado un período mayor que no podrá exceder los dos meses.

Se recomienda conservar los medios de cultivo entre 2 y 25 °C.

SOLUCIONES DE LAVADO Y DILUCION

Solución A - Disolver 1 g de peptona de carne en agua purificada hasta obtener 1 litro, si es necesario filtrar o centrifugar para obtener una solución transparente. Ajustar a p H 7,1 ± 0,2, envasar en recipientes apropiados y esterilizar utilizando un procedimiento validado. [NOTA: cuando la *Solución A* deba ser empleada para realizar el ensayo de esterilidad de una muestra de antibióticos del tipo penicilina, cefalosporina, cefamicina o monobactámico; agregar asépticamente una cantidad de betalactamasa estéril a la *Solución A*, suficiente para inactivar el antibiótico residual en las membranas después que la solución muestra haya sido filtrada].

Solución D - Agregar 1 ml de polisorbato 80 por cada litro de *Solución A* cuando la muestra contiene lecitina o aceite o en los ensayos para determinar la esterilidad de las partes internas de dispositivos estériles por filtración a través de membrana. Ajustar a pH 7,1 ± 0,2. Transferir a los envases y esterilizar.

Solución K -

Peptona de carne ……...	5,00 g
Extracto de carne ……..	3,00 g
Polisorbato 80 ……...	10,0 g
Agua purificada c.s.p. ……...	1.000 ml

pH después de la esterilización: 6,9 ± 0,2.

Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar.

ENSAYO DE VALIDACIÓN

Antes de efectuar un ensayo de esterilidad de un producto dado, se deberá demostrar la ausencia de actividad bacteriostática y fungistática del mismo a través del procedimiento que se describe a continuación. Este procedimiento deberá efectuarse cada vez que se cambia alguna condición del ensayo o cuando exista un cambio significativo en la composición del producto.

Preparar cultivos diluidos de bacterias y hongos de al menos los microorganismos indicados en la *Tabla 1* e incubar en las condiciones especificadas, para obtener una concentración final de cada uno de los microorganismos empleados no mayor de 100 UFC por ml.

Es recomendable incluir al menos una cepa aislada y caracterizada del ambiente de fabricación.

Ensayo de validación del método de filtración por membrana

Filtrar la cantidad de muestra especificada en las *Tablas 2, 3* y *4*. Lavar la membrana, con hasta tres porciones de 100 ml de la solución de lavado inoculando el lavado final con no más de 100 UFC de los microorganismos de prueba. Repetir el lavado en otro filtro en el que no hubo pasaje de muestra (control positivo). Colocar cada membrana o mitad de la membrana en 100 ml del medio de cultivo especificado o agregar el medio especificado al dispositivo que contiene la membrana. Repetir el procedimiento para los microorganismos y los medios especificados en la *Tabla 1* e incubar a la temperatura apropiada y bajo las condiciones señaladas, por un período no menor de 5 días.

Si el crecimiento de los microorganismos en el medio de cultivo fuera visualmente comparable al observado en el control positivo, en adelante efectuar el ensayo de esterilidad en las mismas condiciones.

Si no fuera visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir aumentando número y volumen de lavados hasta un máximo de 5 de 500 ml cada uno, y/o cambiando el tipo de membrana, y/o empleando un agente neutralizante. Si no se logró el desarrollo de los microorganismos inoculados, proceder efectuando el ensayo de esterilidad empleando el método ensayado más exigente.

Ensayo de validación del método de transferencia directa

Inocular dos recipientes de cada medio de cultivo con no menos de 100 UFC de los microorganismos especificados en la *Tabla 1*. El volumen de producto no debe superar el 10 % del volumen de medio de cultivo. Agregar la cantidad de muestra especificada a uno de los recipientes. El otro será el control positivo. Repetir el procedimiento para cada cepa e incubar durante no más de 5 días.

Si el crecimiento de los microorganismos en la mezcla de producto y medio de cultivo fuera visualmente comparable al observado en los frascos de control positivo, en adelante efectuar el ensayo de esterilidad en las mismas condiciones.

Si no fuera visualmente comparable al observado en el control positivo, el producto posee propiedades bacteriostáticas y/o fungistáticas. Repetir el ensayo empleando agentes neutralizantes estériles, como polisorbato 80, lecitina o penicilinasa, o incrementar el volumen de medio. Emplear el menor volumen en el cual el crecimiento de microorganismos en presencia del producto a ensayar no es adversamente afectado. Si se incrementó el volumen del medio a 2 litros y aún se manifiestan propiedades antimicrobianas, proceder con el ensayo de esterilidad utilizando dicho volumen. En caso de ser necesario el uso de grandes volúmenes, convendrá utilizar varios recipientes de menor volumen, o esterilizar medio de cultivo concentrado para diluir antes de usar.

PROCEDIMIENTO GENERAL

El ensayo debe realizarse en condiciones asépticas bajo flujo laminar clase A, según se define en el capítulo 1020, en un área de calidad no inferior a la empleada en la fabricación. Puede realizarse de dos maneras: por transferencia directa de la muestra al medio o mediante el método de filtración por membrana. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, emplear el método de filtración por membrana.

Apertura de envases

Limpiar la superficie exterior de los envases con un agente descontaminante apropiado y acceder al contenido de los mismos en forma aséptica.

Si el contenido de los viales fuera envasado al vacío, se deben compensar las presiones en condiciones asépticas.

Los envases de algodón purificado, gasas, apósitos quirúrgicos, suturas y materiales similares, deben abrirse mediante técnicas asépticas.

Cantidad de muestra y condiciones de incubación

Emplear los números de unidades y cantidades indicados en las *Tablas 2, 3* y *4*.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente o en una sección de este capítulo, incubar la mezcla de ensayo durante 14 días con Medio Tioglicolato o Caldo Tioglicolato Alternativo a una temperatura comprendida entre 30 y 35 °C y con Caldo Digerido de Caseína-Soja a una temperatura comprendida entre 20 y 25 °C.

METODO DE FILTRACION POR MEMBRANA

Membrana - Una membrana apropiada para los ensayos de esterilidad posee un tamaño de poro no mayor de 0,45 µm. Para minimizar la inhibición microbiana de los residuos podrán utilizarse membranas con borde hidrófobo o de baja retención. Si el producto no tiene sustancias inhibidoras puede emplearse una membrana sin borde hidrófobo, pero debe humedecerse antes de agregar la solución con el producto. Cuando el producto a ser ensayado es un aceite, es conveniente que la membrana esté completamente seca antes de realizar el ensayo.

Unidad filtrante - Es un dispositivo que posibilita la manipulación aséptica de las muestras a ensayar, permitiendo la remoción aséptica de la membrana y su incorporación al medio de cultivo o un sistema donde el medio pueda ser agregado y la membrana incubada in situ. El dispositivo puede ser montado y esterilizado con la membrana colocada antes de su empleo.

Soluciones acuosas - Usar para cada medio las cantidades indicadas en las *Tablas 2* y *3*. Salvo que se indique en la monografía, transferir una pequeña porción del diluyente para humedecer la membrana. Transferir el contenido de la muestra a la unidad filtrante. De ser necesario, efectuar una dilución previa. Filtrar. Salvo que el producto no tenga propiedades antimicrobianas, lavar la membrana con diluyente con o sin agregado de antagonistas, según lo demostrado en el *Ensayo de validación*, al menos 3 veces con no menos de 100 ml cada vez, y hasta no más de 5 lavados de 200 ml cada uno. Transferir la membrana completa o cortarla al medio en dos partes iguales, y transferir a los medios adecuados, con o sin antagonistas, según lo demostrado en el *Ensayo de validación*. En caso de sistemas cerrados transferir los medios a las unidades filtrantes. Incubar los medios durante no menos de 14 días.

Sólidos solubles no antibióticos - Usar para cada medio no menos de la cantidad indicada en las *Tablas 2* y *4* disuelta en *Solución A*. Proceder según lo indicado en *Soluciones acuosas*.

Aceites y soluciones oleosas - Usar para cada medio las cantidades indicadas en las *Tablas 2* y *3*. Si la viscosidad es baja, filtrar sin diluir utilizando la membrana completamente seca. Si la viscosidad es alta puede ser necesario diluir en un solvente estéril adecuado, como miristato de isopropilo, que demuestre no tener propiedades antimicrobianas en las condiciones del ensayo. Lavar la membrana al menos 3 veces con no menos de 100 ml cada vez de una solución adecuada, que puede ser *Solución A* con una concentración predeterminada de emulsionante que haya demostrado ser apropiado durante la validación del ensayo, como por ejemplo *Solución K*. Transferir la membrana o membranas a los medios de cultivo. En caso de sistemas cerrados transferir los medios a las unidades filtrantes. Incubar los medios según lo señalado en *Soluciones acuosas.*

Ungüentos y cremas - Usar para cada medio las cantidades indicadas en las *Tablas 2* y *3* ó *4* según corresponda. Los ungüentos con base grasa y las emulsiones pueden diluirse al 1 % en miristato de isopropilo, que demuestre no tener propiedades antimicrobianas en las condiciones del ensayo, de ser necesario calentar hasta no más de 40 ºC. Excepcionalmente podrá admitirse el calentamiento hasta no más de 44 ºC. Filtrar tan rápidamente como sea posible y proceder según lo descripto en *Aceites y soluciones oleosas.*

Jeringas prellenadas - Usar para cada medio las cantidades indicadas en las *Tablas 2* y *3*. Si las jeringas tienen las agujas acopladas, vaciar el líquido a través de la misma en la unidad filtrante o en la solución diluyente. Si la jeringa tiene aguja aparte para acoplar, vaciar directamente el líquido en la unidad filtrante o en la solución diluyente. Proceder según lo descripto en *Soluciones acuosas.* En este último caso evaluar la esterilidad de la aguja por separado según el procedimiento de *Transferencia directa*.

Inyectables distintos de antibióticos sólidos - Usar para cada medio las cantidades indicadas en las *Tablas 2* y *4*. Reconstituir la muestra según las

instrucciones de uso del producto y proceder según lo indicado para *Soluciones acuosas* o *Aceites y Soluciones oleosas* según corresponda. Puede ser necesario el agregado de diluyente en exceso para ayudar en la filtración.

Antibióticos sólidos en graneles y mezclas - Retirar asépticamente una cantidad suficiente de sólido de la cantidad de envases según las *Tablas 2* y *4*, y disolver en *Solución A*, proceder según lo indicado en *Soluciones acuosas.*

Aerosoles - Extraer la muestra asépticamente utilizando el método conveniente, por congelamiento del envase o por uso de válvula continua. Agregar al menos 100 ml de *Solución D*. Mezclar suavemente y proceder según lo indicado en *Soluciones acuosas*.

Dispositivos médicos con guías y jeringas vacías - Pasar un volumen de *Solución D* no inferior a 10 veces el volumen de las guías o jeringas. Recoger los líquidos en un recipiente adecuado y proceder según lo indicado en *Soluciones acuosas.* En el caso de jeringas, si no contienen agujas acopladas o para acoplar, utilizar una aguja sólo para el propósito del ensayo.

METODO DE TRANSFERENCIA DIRECTA

Transferir directamente al medio de cultivo la cantidad de muestra indicada en las *Tablas 2* y *3* ó *4* según corresponda, de modo que el volumen de producto no sea mayor del 10 % del volumen del medio, a menos que se indique de otro modo.

Examinar periódicamente el medio en forma visual para comprobar si hay crecimiento microbiano hasta no menos de 14 días de incubación.

Cuando el material ensayado produce turbidez en el medio y la observación visual del crecimiento de bacterias u hongos es dificultosa, al finalizar el período de incubación, transferir porciones de no menos de 1 ml de la mezcla que contiene la muestra y el medio a en vases con medio de cultivo nuevo. Se debe continuar con la incubación de ambas muestras, la inicial y la transferida por no menos de 4 días adicionales.

Líquidos oleosos - Agregar un agente emulsionante apropiado a los medios de cultivo en concentración tal que durante la validación del ensayo haya demostrado ser adecuada, por ejemplo Polisorbato 80 en una concentración de 10 g por litro.

Ungüentos y cremas - Realizar una dilución aproximadamente 1 e n 10, agregando un agente emulsionante por ejemplo *Solución D*. Transferir el producto diluido a los medios de cultivo. Agitar diariamente, cuidando de hacerlo con suavidad en el Medio Tioglicolato para mantener las condiciones anaeróbicas.

Catgut y otros materiales de sutura para uso veterinario - Abrir el envase asépticamente y retirar 3 secciones de la hebra para cada medio de cultivo de no menos de 30 cm cada una, cortadas del principio, del medio y del final de cada hebra. Utilizar cantidad de medios para cubrir adecuadamente el material a controlar.

Sólidos - Transferir una cantidad de producto en forma de sólido seco o preparar una suspensión del producto en diluyente estéril en el envase primario. Transferir el material obtenido a 200 ml de medios de cultivo y mezclar.

Algodón purificado, gasa, apósitos quirúrgicos y dispositivos relacionados - De cada envase de algodón, o gasa o apósitos, extraer asépticamente 2 o más porciones de 100 a 500 mg cada una de la parte más interna del envase. Si se trata de artículos descartables envasados individualmente, usar todo el contenido del envase. Sumergir en cada uno de los medios de cultivo.

Dispositivos médicos estériles - Sumergir los dispositivos completamente, ensamblados o desmontados, en cantidad suficiente de medios de cultivo, asegurando que la parte interna de los tubos o c onductos estén en contacto con el líquido. Si el dispositivo es demasiado grande, sumergir completamente las porciones que deben entrar en contacto directo con el paciente. Para catéteres en los que se requiere la esterilidad del lúmen interno y de la parte externa, cortar en piezas para que todo esté en contacto con el medio.

OBSERVACIÓN E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A intervalos, durante y al final del período de incubación, examinar los medios de cultivo en busca de evidencia macroscópica de desarrollo microbiano. Si no hay tal evidencia, el producto cumple con el ensayo de esterilidad. Si en cambio hay evidencia de desarrollo microbiano, el producto no cumple con el ensayo, a menos que pueda demostrarse claramente que el ensayo es inválido y que la causa de la contaminación no está relacionada con el producto. Sólo puede invalidarse el ensayo si: a) los resultados del monitoreo ambiental de las instalaciones donde se efectuó el ensayo demostraron falla, b) se demuestra que el procedimiento utilizado para el

ensayo no fue el adecuado, c) hubo desarrollo microbiano en los controles negativos, d) La identificación del contaminante aislado revela inequívocamente que hubo fallas con respecto al material o a la técnica usados.

Si la prueba se declara inválida, se repetirá con el mismo número de unidades de la prueba original. Si no hay desarrollo microbiano en la repetición, el producto cumple con el ensayo de esterilidad. Si en cambio hay desarrollo microbiano, el producto no cumple con el ensayo.

Tabla 1

Medio	Microorganismos de prueba	Incubación	
		Temperatura	Condiciones
Medio Tioglicolato	(1) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) [1]	30 - 35 °C	Aeróbicas
	(2) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) [2]	30 - 35 °C	
	(3) *Clostridium sporogen*es (ATCC 11437) [3]	30 - 35 °C	
Caldo Tioglicolato Alternativo [4]	(1) *Clostridium sporogenes* (ATCC 11437)	30 - 35 °C	Anaeróbicas
Caldo Digerido de Caseína - Soja	(1) *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)	20 - 25 °C	Aeróbicas
	(2) *Candida albicans* (ATCC 10231)	20 - 25 °C	
	(3) *Aspergillus niger* (ATCC 16404)	20 - 25 °C	

(1) Como alternativa al *Staphylococcus aureus*, puede emplearse *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

(2) Como alternativa a *Pseudomonas aeruginosa*, puede utilizarse *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

(3) Como alternativa a *Clostridium sporogenes* y en caso de no ser requerido un esporoformador, puede utilizarse *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482.

(4) Utilizar para test de esterilidad de dispositivos médicos que contienen tubos de pequeño diámetro.

NOTA: PUEDEN UTILIZARSE CEPAS ATCC O SUS EQUIVALENTES PERTENECIENTES A OTRAS COLECCIONES DE CULTIVOS MICROBIANOS INTERNACIONALES O NACIONALES RECONOCIDAS INTERNACIONALMENTE.

Tabla 2. Número mínimo de artículos de muestra en relación al tamaño del lote

Tamaño del lote	*Mínimo número de artículos muestreados para cada medio* *
Productos inyectables	
≦ 100 artículos	10% ó 4 (el que sea mayor)
> 100 - ≤ 500	10
> 500	2% ó 20 (el que sea menor)
Parenterales de gran volumen	2% ó 10 (el que sea menor)
Antibióticos sólidos	
Envases de < 5 g	20
Envases de ≥ 5 g	6
Graneles y mezclas	Ver *Granel de productos sólidos*
Productos no inyectables	
≤ 200	5% ó 2 (el que sea mayor)

> 200	10
Dispositivos médicos	
≤ 100	10% ó 4 (el que sea mayor)
> 100 - ≤ 500	10
> 500	2% ó 20 (el que sea menor)
Granel de productos sólidos	
≤ 4 envases	Todos
> 4 - ≤ 50	20% ó 4 (el que sea mayor)
> 50	2% ó 10 (el que sea mayor)

***** Si el contenido de un envase es suficiente para inocular los dos medios, esta columna indica el número de envases

Tabla 3. Cantidades para productos líquidos

Contenido del envase (ml)	*Volumen mínimo de cada envase para cada medio*
< 1	Todo el contenido
1 - ≤ 40	La mitad del contenido de c/u, y no menos de 1ml
>40 - ≤ 100	20 ml
>100	10% del volumen y no menos de 20 ml
Antibióticos (líquidos)	1 ml

Tabla 4. Cantidades para productos sólidos

Contenido del envase	*Cantidad mínima de cada envase para cada medio*
< 50 mg	Contenido completo
50 mg - < 300 mg	Mitad del contenido pero no menos de 50 mg
300 mg - ≤ 5 g	150 mg
>5 g	500 mg
Antibióticos	150 mg
Algodón, gasa	100 mg
Suturas y otros materiales Descartables	Envase completo
Dispositivos médicos	Dispositivo completo

380. ENSAYOS DE REACTIVIDAD BIOLÓGICA

Estos ensayos están diseñados para determinar la reactividad biológica de materiales elastoméricos, plásticos y otros polímeros destinados a estar en contacto directo o indirecto con pacientes. Pueden realizarse *in vitro* o *in vivo*.

Para los objetivos establecidos en este capítulo se aplican las siguientes definiciones: la muestra es el material o un extracto preparado a partir del mismo; el blanco consiste en la misma cantidad del mismo medio empleado en la extracción de la muestra, tratado de la misma forma que el medio que contiene la muestra a ensayar; el control negativo es un material que produce una reactividad reproducible y despreciable en las condiciones del ensayo y el control positivo es un material que produce una reactividad reproducible y de citotoxicidad moderada en las condiciones del ensayo, como por ej., látex de goma.

Los materiales poliméricos deben ensayarse en las condiciones en que van a ser empleados. Si los materiales van a ser sometidos a procedimientos de limpieza y/o esterilización, la muestra debe ser preparada con material preacondicionado del mismo modo.

ENSAYOS DE REACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO*

Estos ensayos evalúan la reactividad biológica de cultivos de células de mamíferos después del contacto con materiales elastoméricos, plásticos y otros polímeros o de extractos específicos preparados a partir de los mismos.

Se describen tres ensayos: el *Ensayo de Difusión en Agarosa*, el *Ensayo de Contacto Directo* y el *Ensayo de elución*. La elección del tipo o número de ensayos a emplear para la evaluación de la respuesta biológica de una determinada muestra o extracto depende del material empleado, del producto final y del uso posterior.

Preparación del cultivo celular - Preparar múltiples cultivos de la línea celular L-929 (tejido conectivo de ratón, monocapa epitelial) en medio de cultivo Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEN) suplementado con suero fetal bovino al 10 %, glutamina 0,3 %, aminoácidos no esenciales 1 %, con una densidad de sembrado de 4.10^5 células por ml. Incubar a 37 ± 1 °C en una estufa de cultivo en atmósfera humidificada de 5 ± 1 % de dióxido de carbono en aire durante 24 horas hasta que la monocapa alcance una confluencia mayor al 80 %. Examinar los cultivos preparados con un microscopio invertido para asegurar monocapas uniformes casi confluentes.

[NOTA: la reproducibilidad de los ensayos de reactividad biológica *in vitro* depende de la obtención de una densidad de cultivo uniforme.]

Solventes de extracción - Emplear Solución fisiológica (SR) estéril. Pueden emplearse también medios de cultivo para células de mamífero sin suero o medios de cultivo de células de mamífero suplementados con suero cuando la extracción se realiza a 37°C durante 24 horas.

Aparatos - Emplear un autoclave; una estufa, preferiblemente de convección forzada, que mantenga las temperaturas de operación entre 50 y 70 ± 2 °C; una estufa de cultivo, capaz de mantener una temperatura de 37 ± 1 °C y una atmósfera humidificada de 5 ± 1 % de dióxido de carbono en aire.

Materiales –

Envases de extracción - Emplear envases con tapa a rosca de vidrio Tipo I. Si la tapa a rosca contiene una cubierta interna elastomérica, ésta debe estar totalmente protegida con material inerte de 50 a 75 µm de espesor.

Preparación del material - Limpiar cuidadosamente todo el material de vidrio con mezcla sulfocrómica y, si fuera necesario, con ácido nítrico caliente seguido de lavados con *Agua para Inyectables*. Esterilizar y secar los envases e instrumental empleados para la extracción, transferencia o administración del material de ensayo.

Procedimiento –

Preparación muestra - Seleccionar y subdividir la muestra según se indica en la *Tabla 1*.

Es esencial la relación entre la superficie expuesta a la extracción y el volumen de solvente de extracción. Cuando la superficie de la muestra no pueda ser determinada emplear 0,1 g de elastómero ó 0,2 g de material plástico u otro material por cada ml de medio de extracción.

Transferir la muestra subdividida a una probeta graduada, estéril, de vidrio Tipo I de 100 ml, provista de un tapón de vidrio. Lavar dos veces con aproximadamente 70 ml de *Agua para Inyectables*, agitando durante 30 segundos en cada lavado y eliminando completamente el agua de lavado. Secar las piezas destinadas a la extracción con *Aceite Vegetal*, en estufa que no exceda los 50 °C. [NOTA: la muestra no se debe limpiar con paño húmedo o seco, ni lavar o enjuagar con solventes

orgánicos, detergentes, etc.]. Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación con microorganismos u otros materiales extraños.

Preparación de extractos - Transferir al envase de extracción 20 ml de solución fisiológica (SR) estéril o medio de cultivo para células de mamífero sin suero como solvente de extracción y agregar las piezas de la muestra individualmente. Repetir este procedimiento para cada medio de extracción requerido en el ensayo. Preparar un blanco con 20 ml de cada medio de extracción. Realizar la extracción por calentamiento en autoclave a 121 °C durante 60 minutos o en estufa a 70 °C durante 24 horas o a 50 °C durante 72 horas. [NOTA: si la extracción se realiza a 37 °C durante 24 horas, en estufa de cultivo, emplear el medio de cultivo celular suplementado con suero.]

[NOTA: las condiciones de extracción no deben causar alteraciones físicas como fusión o aglomeración de los trozos del material plástico, pues esto provocaría una reducción del área expuesta; sólo es aceptable una leve adherencia del material. Siempre agregar las piezas limpias individualmente al medio de extracción.]

Enfriar a temperatura ambiente, pero no menor de 20 °C. Agitar vigorosamente durante algunos minutos y transferir, inmediatamente en forma aséptica, cada extracto a un recipiente seco y estéril. Almacenar los extractos a temperatura entre 20 y 30 °C y emplearlos dentro de las 24 horas.

ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAROSA

Este ensayo se emplea para evaluar materiales poliméricos o sus respectivos extractos. En este ensayo la capa de agarosa protege a la monocapa celular de un eventual daño mecánico, al mismo tiempo que permite la difusión de productos químicos cedidos por la muestra. Cuando se analizan extractos, éstos se aplican sobre una porción de papel de filtro atóxico.

Preparación muestra - Emplear porciones de la muestra que tengan una superficie plana no menor de 100 mm^2 o preparar extractos según se indica en *Preparación de extractos* y aplicar 50 µl del extractivo sobre papel de filtro de superficie no menor de 100 mm^2.

Preparación de controles positivos y negativos - Proceder según se indica en *Preparación muestra*.

Procedimiento - Preparar monocapas en placas de cultivo de 35 mm de diámetro, sembrando 2 ml de la suspensión celular según se indica en *Preparación del cultivo celular*. Luego de la incubación aspirar el medio de cultivo y reemplazarlo con un medio preparado mezclando partes iguales del medio de cultivo y de agarosa al 0,7 %.

Transferir la muestra, el *control positivo* y el *control negativo*, o sus respectivos extractos, por duplicado, en contacto con la superficie de la agarosa solidificada de diferentes placas. Incubar todas las placas durante 24 horas a 37 ± 1 °C, en la estufa de cultivo. Fijar, remover la capa de agarosa y teñir con un colorante citoquímico. Examinar en cada cultivo la reactividad alrededor de la muestra, del *control positivo* y del *control negativo.*

Interpretación de los resultados – La reactividad biológica (degeneración y malformación celular) se describe y se califica en una escala de 0 a 4 (ver *Tabla 2*). Medir las respuestas obtenidas con el *control negativo*, el *control positivo* y la muestra. El ensayo es válido si la respuesta observada con el *control negativo* es grado 0 (ninguna reactividad) y para el *control positivo* no es menor que grado 3 (reactividad moderada). La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la respuesta observada no es mayor de grado 2 (reactividad leve). Repetir el ensayo si no se confirma su validez.

ENSAYO DE CONTACTO DIRECTO

Este ensayo se emplea para evaluar materiales poliméricos. El procedimiento permite la extracción y ensayo simultáneo de los componentes químicos extraídos desde la muestra con un medio suplementado con suero. Este ensayo no es apropiado para materiales de muy baja densidad ni alta densidad que puedan causar daño mecánico a las células.

Preparación muestra – Emplear porciones de muestra que tengan superficies planas no menores de 100 mm^2.

Preparación de controles positivos y negativos – Proceder según se indica en *Preparación muestra*.

Procedimiento – Preparar monocapas en placas de cultivo de 35 mm de diámetro empleando 2 ml de la suspensión de células preparadas según se indica en *Preparación del cultivo celular*. Luego de la incubación, aspirar el sobrenadante del medio de cultivo y reemplazarlo con 0,8 ml de medio de cultivo fresco. Colocar en diferentes placas de cultivo la muestra, el *control positivo* y el *control negativo*, todos por duplicado. Incubar todas las placas durante 24 horas a 37 ± 1 °C, en estufa de cultivo. Fijar, lavar y teñir con un colorante citoquímico. Examinar en cada cultivo la

reactividad alrededor de la muestra, del *control positivo* y del *control negativo.*

Interpretación de los resultados – Proceder según se indica para *Interpretación de los Resultados* en *Ensayo de Difusión en Agarosa*. La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la respuesta observada no es mayor que grado 2 (reactividad leve). Repetir el ensayo si no se confirma su validez.

ENSAYO DE ELUCIÓN

Este ensayo se emplea para evaluar extractos de materiales poliméricos. El procedimiento permite la extracción de la muestra a temperatura fisiológica o no fisiológica, variando los intervalos de tiempo. Es apropiado para materiales de alta densidad y para evaluaciones dosis-respuesta.

Preparación muestra – Proceder según se indica en *Preparación de los extractos*. Alternativamente, emplear medio de cultivo de células de mamífero suplementado con suero como medio de extracción para simular las condiciones fisiológicas. Preparar los extractos incubando 24 horas en estufa de cultivo para evitar la desnaturalización de las proteínas del suero.

Preparación de los controles positivos y negativos – Proceder según se indica en *Preparación muestra*.

Procedimiento – Preparar las monocapas en placas de 35 mm de diámetro empleando 2 ml de suspensión de células, preparada según se indica en la *Preparación del cultivo celular*. Luego de la incubación, aspirar el medio de cultivo de las monocapas y reemplazarlo con los extractos de la muestra, del *control positivo* y del *control negativo*. Los extractos con medio de cultivo con y sin suero se ensayan por duplicado sin dilución. El extracto preparado con Solución fisiológica (SR) estéril se diluye con medio de cultivo suplementado con suero hasta una concentración del 25 % del extracto y se realiza el ensayo por duplicado. Incubar todas las placas durante 48 horas a 37 ± 1 °C, con estufa de cultivo. Fijar, lavar y teñir con un colorante citoquímico. Examinar en cada cultivo la reactividad de la monocapa celular bajo microscopio.

Interpretación de los resultados – Proceder según se indica para *Interpretación de los Resultados* en *Ensayo de Difusión en Agarosa* pero empleando la *Tabla 3*. La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la respuesta observada no es mayor que grado 2 (reactividad media). Repetir el ensayo si no se confirma su validez. Para evaluaciones dosis-respuestas, repetir el procedimiento, empleando diluciones cuantitativas de los extractos.

ENSAYOS DE REACTIVIDAD BIOLOGICA *IN VIVO*

Estos ensayos evalúan la respuesta biológica de animales frente a materiales elastoméricos, plásticos y otros polímeros o de extractos específicos preparados a partir de los mismos.

Se describen tres ensayos: el *Ensayo de Inyección Sistémica*, el *Ensayo Intracutáneo* y el *Ensayo de Implantación*.

El *Ensayo de Inyección Sistémica* y el *Ensayo Intracutáneo* se emplean para evaluar la respuesta sistémica y local respectivamente, luego de la inyección de una sola dosis de extractos específicos del material a ensayar. El *Ensayo de Implantación* evalúa la reacción del tejido vivo luego de la implantación del material como tal.

El *Ensayo de Inyección Sistémica* y el *Ensayo Intracutáneo* se aplican a materiales elastoméricos, especialmente cierres elastoméricos, con significativa reactividad positiva en el *Ensayo de Reactividad Biológica in vitro*.

Estos tres ensayos se emplean también para evaluar materiales destinados a la fabricación de envases y otros accesorios para uso en preparaciones parenterales y para uso en dispositivos biomédicos e implantes.

Sustancia de referencia - Polietileno de alta densidad SR-FA (control negativo).

Medios de extracción –

Solución fisiológica (SR) estéril.

Solución de alcohol en Solución fisiológica (SR) estéril (1 en 20).

Polietilenglicol 400.

Aceite Vegetal - Aceite de sésamo (preferentemente recién refinado) u otro aceite vegetal apropiado.

Vehículo de la droga (cuando corresponda).

Agua para Inyectables.

[NOTA: el aceite de sésamo u otro aceite vegetal debe cumplir con el siguiente requisito: obtener el aceite, si es posible recién refinado. Emplear tres animales e inyectarles el aceite por vía intracutánea en una dosis de 0,2 ml en diez sitios diferentes por animal y observarlos a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inyección. Calificar la reacción en cada sitio según se indica en la *Tabla 4*. Para tres conejos (treinta sitios de inyección), en cualquier período de observación, la respuesta promedio eritematosa no debe ser mayor de 0,5 y la repuesta promedio edematosa no debe ser mayor de 1,0 y ningún sitio de inyección debe presentar una reacción de diámetro mayor que 10 mm. El residuo

de aceite en el sitio de inyección no debe mal interpretarse como edema. El tejido edematoso se blanquea cuando se presiona suavemente.]

Aparatos - Emplear un autoclave y una estufa, preferentemente de convección forzada, que mantenga las temperaturas entre 50 y 70 ± 2 °C.

Materiales - Proceder según se indica en *Materiales* en *Ensayo de reactividad biológica in vitro*.

[NOTA: limpiar el instrumental para cortar la muestra por un método apropiado (por ej., sucesivas limpiezas con acetona y cloruro de metileno), antes de subdividir el material.]

Procedimiento –

Preparación muestra - Proceder según se indica para *Preparación muestra* en *Ensayos de reactividad biológica in vitro*. El *Ensayo de Inyección Sistémica* y el *Ensayo Intracutáneo* se llevan a cabo empleando el mismo extracto o, si se prefiere, se preparan extractos individuales para cada ensayo.

Preparación de extractos - Proceder según se indica para *Preparación de extractos* en *Ensayos de reactividad biológica in vitro* pero empleando un medio de extracción apropiado.

ENSAYO DE INYECCION SISTEMICA

Este ensayo se emplea para evaluar la respuesta sistémica a los extractos de los materiales bajo ensayo, luego de la inyección a ratones.

Animales - Emplear ratones albinos sanos, no empleados en ensayos anteriores, que pesen entre 17 y 23 g. Para cada grupo emplear ratones de un mismo origen. Proveer agua y alimento *ad libitum*.

Procedimiento - [NOTA: agitar cada extracto vigorosamente antes de extraer la dosis a inyectar, asegurando una perfecta homogeneización del extracto]. Tratar un grupo de cinco ratones con la muestra o el blanco según se indica en la *Tabla 5*, pero diluir cada gramo de muestra preparada con polietilenglicol 400 y su correspondiente blanco con 4,1 volúmenes de Solución fisiológica (SR) estéril, hasta obtener una solución que contenga aproximadamente 200 mg de polietilenglicol 400 por ml.

Interpretación de los resultados - Luego de la inoculación, observar los animales a las 4, 24, 48 y 72 horas. La muestra cumple con los requisitos del ensayo si, durante el período de observación, ninguno de los animales inoculados con la muestra presenta un grado de reactividad biológica significativamente mayor que los animales inoculados con el blanco. Si dos o más ratones mueren o presentan un comportamiento anormal como convulsiones o postración; o si la pérdida de peso es mayor de 2 g en tres o más ratones, la muestra no cumple con los requisitos del ensayo.

Si algunos animales inyectados con la muestra presentan síntomas leves de reactividad biológica y no más de un animal presenta graves síntomas de reactividad biológica o muere, repetir el ensayo empleando grupos de diez ratones.

Luego de repetir el ensayo, la muestra cumple con los requisitos del ensayo si, durante el período de observación, ninguno de los animales inyectados con la muestra presenta un grado de reacción mayor que el observado en los animales inyectados con el blanco.

ENSAYO INTRACUTÁNEO

Este ensayo se emplea para evaluar las respuestas locales a los extractos en estudio, luego de la inyección intracutánea en conejos.

Animales - Seleccionar conejos albinos de piel fina, cuyo pelaje pueda ser rasurado sin provocar irritación o trauma mecánico en la piel. En el manipuleo de los animales evitar tocar el lugar de la inyección, salvo para discriminar entre edema y residuo de aceite. [NOTA: pueden emplearse conejos que hayan sido empleados previamente en ensayos no relacionados, como por ej., para la determinación de piretógenos y hayan permanecido sin tratar durante el período de recuperación indicado, además de presentar la piel totalmente limpia y sin manchas.]

Procedimiento - [NOTA: agitar vigorosamente cada extracto antes de extraer la dosis a inyectar para asegurar una perfecta homogeneización de la muestra.] Rasurar el pelo del animal antes del ensayo, a ambos lados de la columna vertebral en una extensión suficientemente amplia para el ensayo. Evitar irritación o traumatismo mecánico. Extraer el pelo remanente por aspiración. Si fuera necesario, limpiar la piel suavemente con alcohol diluido y secarla antes de la inyección. Puede emplearse más de un extracto por cada tipo de material por conejo, si se ha determinado que esto no altera el resultado del ensayo. Emplear dos animales para cada muestra e inyectarlos intracutáneamente empleando un lado para la muestra y el opuesto para el blanco, según se indica en la *Tabla 6*. [NOTA: diluir cada gramo del *Extracto de la muestra* preparado con polietilenglicol 400 y el blanco correspondiente, con 7,4 volúmenes de Solución fisiológica (SR) estéril, hasta obtener una concentración de aproximadamente 120 mg de polietilenglicol por ml.]

Interpretación de los resultados - Examinar la presencia de eritema, edema y necrosis como reacciones del tejido en los sitios de inyección. Lavar la piel suavemente, si fuera necesario, con alcohol diluido para facilitar la observación de los sitios de inyección. Observar todos los animales a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la inyección.

Calificar las observaciones según se indica en la *Tabla 4*. Recortar el pelo, si fuera necesario, durante el período de observación. La calificación promedio para eritema y edema en los sitios de inyección de muestra y blanco se determina en cada período de tiempo (24, 48 y 72 horas) para cada conejo. Una vez transcurridas las 72 horas, todas las calificaciones para eritema más todas las calificaciones para edema se totalizan separadamente para muestra y blanco. Dividir cada total por 12 (dos animales por 3 períodos de calificación por 2 categorías de calificación) para determinar la calificación promedio total de cada muestra frente a su correspondiente blanco. La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la diferencia entre la calificación promedio total de la muestra y del blanco es igual o menor a 1,0. Si en algún período de observación la reacción promedio de la muestra es significativamente mayor a la reacción promedio del blanco, repetir el ensayo empleando tres conejos adicionales. La muestra cumple con los requisitos del ensayo si la diferencia entre la calificación promedio de la muestra y del blanco es igual o menor a 1,0.

ENSAYO DE IMPLANTACIÓN

Este ensayo se emplea para evaluar materiales plásticos y otros materiales poliméricos destinados a estar en contacto directo con tejidos vivos. Es sumamente importante la apropiada preparación de los implantes y su implantación en condiciones asépticas.

Preparación muestra - Preparar para la implantación 8 tiras de muestra y 4 tiras de la *Sustancia de referencia*. Cada tira debe medir no menos de 10 mm x 1 mm. Los bordes de las tiras deben ser tan lisos como sea posible para evitar traumas mecánicos, adicionales a la implantación. Las tiras se implantan por medio de una aguja hipodérmica con punta intravenosa. Emplear agujas preesterilizadas dentro de las cuales las tiras de plástico son insertadas asépticamente o insertar cada tira limpia dentro de una aguja y someterla luego a un procedimiento de esterilización apropiado. [NOTA: realizar un desgasificado apropiado si agentes tales como óxido de etileno son empleados.]

Animales - Seleccionar conejos adultos sanos que pesen no menos de 2,5 kg y cuyo músculos paravertebrales sean suficientemente grandes en tamaño para permitir la implantación de las muestras. No emplear ningún otro tejido muscular distinto que el paravertebral. Los animales deben ser anestesiados con un grado de profundidad que inhiba los movimientos musculares.

Procedimiento - Realizar el ensayo en un área limpia. En el día del ensayo o dentro de las 20 horas previas, rasurar el pelo de los animales a ambos lados de la columna vertebral. Extraer el pelo remanente por aspiración. Limpiar suavemente la piel con alcohol diluido antes de la inyección.

Implantar en el músculo paravertebral de dos conejos, 4 tiras de la muestra en sitios ubicados a una distancia de 2,5 a 5 cm de la línea media, paralelos a la columna vertebral y separados entre sí por 2,5 cm. De manera similar, implantar 2 tiras de la *Sustancia de referencia*, en el lado opuesto de la columna vertebral de cada animal. Insertar un estilete estéril dentro de la aguja para ayudar a implantar la muestra en el tejido mientras se retira la aguja. Si se observa excesivo sangrado luego de la implantación de una tira, colocar un duplicado en otro sitio.

Mantener los animales por un período no menor de 120 horas y sacrificarlos al finalizar dicho período administrando una sobredosis de un agente anestésico u otro agente apropiado.

Esperar suficiente tiempo para cortar el tejido sin sangrado.

Interpretación de los resultados - Examinar empleando una lupa y una fuente de luz auxiliar el área de tejido que rodea cada implante. Observar los sitios de implante de la muestra y de la *Sustancia de referencia* para detectar hemorragia, necrosis; decoloraciones e infecciones y registrar las observaciones. Medir la encapsulación, si la hubiere, registrando el ancho de la cápsula (desde la periferia del sitio del implante de la muestra o de la *Sustancia de referencia* hasta la periferia de la cápsula) con una aproximación de 0,1 mm. Calificar la encapsulación de acuerdo a la *Tabla 7*. Calcular las diferencias entre el promedio de la calificación para los sitios de la muestra y de la *Sustancia de referencia*. La muestra cumple con los requisitos si la diferencia no es mayor de 1,0 o si la diferencia entre las calificaciones medidas de la muestra y la *Sustancia de referencia* para más de uno de los cuatro sitios de implante no es mayor de 1,0 para alguno de los animales implantados.

Tabla 1. Superficie de la muestra a emplear.

Forma del material	Espesor	Cantidad de muestra por cada 20 ml de solvente de extracción	Subdivisión (mm)
Láminas	< 0,5 mm	120 cm^2 de superficie total (ambas caras)	Tiras de 5 × 0,3 cm
	0,5 a 1 mm	60 cm^2 de superficie total (ambas caras)	
Tubos	< 0,5 mm (pared)	Longitud (em cm) = 120 cm^2⁄suma diámetro interno y diámetro externo circunferencia	Secciones de 5 × 0,3 cm
	0,5 a 1 mm (pared)	Longitud (em cm) = 60 cm^2⁄suma diámetro interno y diámetro externo circunferencia	
Moldeados	> 1 mm	60 cm^2 de superficie total (todas las superficies expuestas)	Piezas de hasta 5 × 0,3 cm
Elastómeros	> 1 mm	25 cm^2 de superficie total (todas las superficies expuestas)	No subdividir

[NOTA: los cierres elastoméricos moldeados de ensayan intactos]

Tabla 2. Grados de reactividad para el Ensayo de difusión en agar y Contacto directo.

Grado	Reactividad	Descripción de la zona de reactividad
0	Ninguna	No hay zona detectable alrededor de o debajo de la muestra.
1	Débil	Algunas células degeneradas o con malformaciones debajo de la muestra.
2	Leve	Zona limitada al área debajo de la muestra.
3	Moderada	Zona que se extiende 0,5 a 1,0 cm mas allá de la muestra.
4	Severa	Zona que se extiende más de 1,0 cm desde la muestra, pero que no abarca la placa en su totalidad.

Tabla 3. Grados de reactividad en el Ensayo de elusión

Grado	Reactividad	Condición de todos los cultivos
0	Ninguna	Discretos gránulos intracitoplasmáticos sin lisis celular.
1	Leve	No más del 20 % de la células son redondas, levemente adheridas, sin gránulos intracitoplasmáticos, con escasa lisis celular.
2	Media	No más del 50 % de las células son redondas y desprovistas de gránulos intracitoplasmáticos ; no hay lisis celular extensiva y áreas vacías entre células.
3	Moderada	No más del 70 % de las células son redondas o están lisadas.
4	Severa	Destrucción casi total de la capa de células.

Tabla 4. Análisis de las reacciones en piel para el Ensayo intracutáneo.

Formación de eritema o escara	Valor
Ausencia de eritema	0
Ligero eritema (casi imperceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema severo a ligera formación de escara	4
Formación de edema	**Valor**
Ausencia de edema	0
Edema muy ligero (casi imperceptible)	1
Edema ligero con bordes bien definidos	2
Edema moderado (elevado aproximadamente 1 mm)	3
Edema severo (elevado más de 1 mm y extendido más allá del área de inoculación)	4

Tabla 5. Ensayo de inyección sistémica.

Solución extractiva o blanco	Dosis por Kg de peso corporal	Vía	Velocidad de inoculación (ml/s)
Solución fisiológica (SR) estéril	50 ml	IV*	0,1
Solución 1:20 de alcohol en solución fisiológica (SR) estéril	50 ml	IV	0,1
Solución inyectable de polietilenglicol 400	10 g	IP*	_
Vehículos de la droga	50 ml	IV	0,1
(si corresponde)	50 ml	IP	_
Aceite vegetal	50 ml	IP	_

*IV = I ntravenosa (solución acuosa de muestra y blanco); *IP = I ntraperitoneal (solución oleosa de muestra y blanco).

Tabla 6. Ensayo intracutáneo.

Extracto o blanco	Número de sitios (por animal)	Dosis, µl por sitio
Muestra	5	200
Blanco	5	200

Tabla 7. Evaluación de la encapsulación en el Ensayo de implantación.

Tamaño de la cápsula	Valor
Ninguno	0
Hasta 0,5 mm	1
0,6 – 1,0 mm	2
1,1 – 2,0 mm	3
Mayor que 2,0 mm	4

383. ENSAYOS DE SUTURAS

Ver *383. Ensayos de Suturas* en *Apartado de Productos Médicos* en *Volumen III.*

385. ENSAYOS EN HEMODERIVADOS

Ver *385. Ensayos en Hemoderivados* en *Apartado de Hemoderivados* en *Volumen III.*

390. ENSAYOS FARMACOTÉCNICOS PARA AEROSOLES

PROPELENTES

Precaución - Algunos hidrocarburos empleados como propelentes en aerosoles son altamente inflamables y explosivos. Tomar las precauciones necesarias y realizar la toma de muestra en un lugar ventilado.

Procedimiento general de toma de muestra - Este procedimiento se emplea para obtener muestras de propelentes que se encuentran en estado gaseoso a 25 °C y que se almacenan en cilindros presurizados. Para la toma de muestra, emplear un cilindro de acero inoxidable con una capacidad no menor de 200 ml y que soporte una presión de 240 psi o mayor, equipado con una válvula de acero inoxidable. Secar el cilindro con la válvula abierta a 110 °C durante 2 horas y efectuar vacío en el cilindro caliente a menos de 1 mm Hg. Cerrar la válvula, enfriar y pesar. Conectar un extremo de la línea de carga al envase del propelente y el otro extremo, sin ajustar, al cilindro. Cuidadosamente abrir el envase del propelente y dejar que éste escape por la línea de carga, a través de la conexión floja. [NOTA: evitar un escape excesivo, ya que esto causa la congelación de la humedad condensada en la línea de carga y en las conexiones.] Ajustar la conexión al tubo y abrir la válvula del cilindro para que el propelente pase al cilindro. Continuar hasta obtener la cantidad de muestra deseada luego cerrar la válvula del envase de propelente y finalmente cerrar la válvula del cilindro. Nuevamente pesar el cilindro y calcular el peso de muestra.

Temperatura de ebullición aproximada - Transferir 100 ml de muestra a un balón de destilación, el cual contiene unos pocos trozos de material poroso, y pesar. Suspender un termómetro en el líquido y colocar el balón en un medio mantenido a una temperatura 32 °C por encima de la temperatura de ebullición esperada. Cuando la lectura del termómetro permanezca constante, registrar ésta como la temperatura de ebullición, luego que el 5 % de la muestra haya destilado. Conservar el resto de la muestra para la determinación de *Residuos de alto punto de ebullición*.

Residuos de alto punto de ebullición –

Método I - Destilar 85 ml de muestra según se indica en el ensayo para *Temperatura de ebullición aproximada* y transferir el balón que contiene los restantes 15 ml a un medio mantenido a una temperatura 10 °C por encima de la temperatura de ebullición. Después de 30 minutos, retirar el balón del baño de agua, secarlo externamente y pesarlo. Calcular el peso del residuo.

Método II – Emplear una serpentina de enfriamiento con un tubo de cobre (aproximadamente de 6,1 m de largo y 6 mm de diámetro exterior). Sumergir la serpentina de enfriamiento en un frasco Dewar que contiene una mezcla de hielo seco y acetona y conectar un extremo del tubo al cilindro que contiene la muestra. Abrir cuidadosamente la válvula del cilindro y lavar la serpentina de enfriamiento con aproximadamente 50 ml de propelente, descartando esta porción de propelente licuado. Continuar licuando el propelente a través de la serpentina de enfriamiento y recolectar el líquido en un vaso de precipitados de 1 litro, previamente enfriado, hasta completar a volumen. Dejar que el propelente se evapore, empleando un baño de agua mantenido aproximadamente a 40 °C para acelerar la evaporación. Cuando todo el líquido se haya evaporado, lavar el vaso de precipitados con dos porciones de 50 ml de pentano y combinar los lavados en un cristalizador de 150 ml, previamente pesado. Transferir 100 ml de pentano a un segundo cristalizador de 150 ml, previamente pesado, colocar ambos cristalizadores en un baño de agua, evaporar hasta sequedad y calentar los cristalizadores en una estufa a 100 °C durante 60 minutos; enfriarlos en un desecador y pesar. Repetir el calentamiento durante períodos de 15 minutos hasta que la variación de peso en sucesivas pesadas no sea mayor de 0,1 mg. Calcular el peso del residuo obtenido a partir del propelente como la diferencia entre los pesos de los residuos en los dos cristalizadores.

Contenido de agua - Proceder según se indica en *<120>. Determinación de agua*, considerando las siguientes modificaciones:

a) Emplear un recipiente de titulación cerrado, con una abertura para introducir un tubo de dispersión de gases, de porosidad gruesa, conectado al cilindro para la toma de muestra.

b) Diluir el reactivo con metanol anhidro hasta obtener un factor de equivalencia de agua de 0,2 a 1,0 mg por ml. Dejar en reposo esta solución durante no menos de 16 horas antes de la estandarización.

c) Obtener una muestra de 100 g según se indica en *Procedimiento general de toma de muestra*, e introducirla en el recipiente de

titulación mediante el tubo de dispersión de gases a un flujo de aproximadamente 100 ml por minuto.

AEROSOLES

Aerosoles de válvula continua

Contenido neto - Los aerosoles de válvula continua deben cumplir con los requisitos para aerosoles indicados en *<220>. Determinación del contenido neto del envase*.

Velocidad de pérdida - Seleccionar doce unidades y registrar fecha y hora. Registrar el peso de cada unidad, en mg, como P_1. Dejar los envases en posición vertical a temperatura ambiente durante no menos de 3 días y nuevamente registrar el peso de cada unidad, en miligramos, como P_2. Registrar además la fecha y hora. Determinar el tiempo de duración del ensayo, T, en horas. Calcular la velocidad de pérdida, en mg por año, de cada unidad ensayada, por la fórmula siguiente:

$$(365)(24/T)(P_1 - P_2)$$

Cuando se ensayen envases de vidrio recubiertos por plástico, secarlos en un desecador durante 12 a 18 horas y mantenerlos en un ambiente de humedad controlada durante 24 horas antes de determinar el peso inicial. Vaciar el contenido de cada envase. Retirar el contenido residual mediante el lavado con solventes apropiados y posteriormente lavar con porciones de metanol. Retener como una unidad el envase, la válvula y todas las partes asociadas al mismo y calentar a 100 °C durante 5 minutos. Enfriar, pesar y registrar el peso como P_3. Determinar el peso neto como $(P_1 - P_3)$ para cada unidad. Los requisitos se cumplen si la velocidad de pérdida promedio por año para las doce unidades es menor de 3,5 % del peso neto, y ninguna debe tener pérdidas mayores a 5,0 % del peso neto por año. Si una unidad tiene pérdidas mayores a 5,0 % por año pero ninguna tiene pérdidas mayores a 7,0 % por año, se debe determinar la velocidad de pérdida sobre veinticuatro unidades adicionales. No más de dos de las treinta y seis unidades deben tener pérdidas mayores a 5,0 % del peso neto por año y ninguna de las treinta y seis unidades deben tener pérdidas mayores a 7,0 % del peso neto por año. Cuando el peso neto es menor de 15 g, los requisitos se cumplen si la velocidad de pérdida promedio de las doce unidades es menor a 525 mg por año y ninguna debe tener pérdidas mayores a 750 mg por año. Si una unidad tiene pérdidas mayores a 750 mg por año, pero menores a 1,1 g por año, determinar la velocidad de pérdida sobre veinticuatro unidades adicionales. No más de dos de las treinta y seis unidades deben tener pérdidas mayores a 750 mg por año y ninguna de las treinta y seis unidades deben tener pérdidas mayores a 1,1 g por año.

Ensayo de presión - Seleccionar no menos de cuatro unidades, quitarles las tapas y sumergirlas en un baño a 25 °C. Extraer los aerosoles del baño, agitar, retirar el disparador (comúnmente llamado también actuador) y el agua, si la hubiera, del extremo de la válvula. Colocar cada aerosol en posición vertical y determinar la presión en cada unidad colocando un manómetro en el extremo de la válvula, sostener firmemente y accionar la válvula para que se abra completamente. Leer y registrar la presión directamente del manómetro.

Caudal de válvula – Seleccionar no menos de cuatro unidades. Accionar cada válvula durante 2 a 3 segundos. Pesar cada unidad con exactitud y sumergirlas en un baño a 25 °C. Retirar los envases del baño y secarlos. Accionar cada válvula durante 5,0 segundos (tomando exactamente el tiempo con un cronómetro) y pesar cada unidad nuevamente. Regresar los envases al baño de temperatura constante y repetir el procedimiento tres veces para cada unidad. Calcular el caudal emitido promedio, en g por segundo, para cada unidad.

Aerosoles dosificadores

Número total de descargas por envase - Realizar este ensayo a los aerosoles dosificadores al mismo tiempo y en los mismos envases empleados para el ensayo de *Uniformidad de contenido de la dosis*. Determinar el número total de descargas incluyendo el número de descargas de purga (preparatorias) más aquellas empleadas en la determinación del contenido y continuar descargando hasta vaciar completamente el envase. Los requisitos se cumplen si todos los envases ensayados proporcionan un número de descargas no menor al declarado en el rótulo.

Peso de la dosis - Seleccionar diez aerosoles completos con sus respectivos disparadores, identificar claramente cada envase y realizar el siguiente procedimiento para cada una de las diez unidades. Agitar durante no menos de 5 segundos y con el extremo de la válvula orientado según el sentido de uso emitir una sola descarga. Repetir el procedimiento hasta eliminar un total de 5 descargas. Después de 1 minuto, pesar la unidad y registrar el peso, como P_1. Agitar nuevamente durante 5 segundos y con el extremo de la válvula orientado según el sentido de uso,

emitir una sola descarga. Después de 1 minuto, pesar la unidad y registrar el peso, como P_2. Calcular el peso, PD_1, descargado de cada unidad, según la fórmula siguiente:

$$P_1 - P_2$$

Colocar cada uno de los diez aerosoles, equipados con su disparador, en posición vertical con el extremo de la válvula según el sentido inverso al uso y mantener las unidades sin perturbaciones durante 6 horas o el período que debe transcurrir entre dosis, según se declare en el rótulo. Transcurrido el período indicado, invertir cada unidad con el extremo de la válvula orientado según el sentido de uso, agitar bien la unidad y de inmediato emitir una sola descarga. Pesar la unidad y registrar el peso, como P_3. Calcular el peso, PD_2, descargado de cada unidad, según la fórmula siguiente:

$$P_2 - P_3$$

Para cada unidad ensayada, calcular el porcentaje de variación en los pesos de las descargas empleando la fórmula siguiente:

$$100\ (PD_2 / PD_1)$$

Los requisitos del ensayo se cumplen si no más de uno de los diez resultados se encuentra fuera del intervalo comprendido entre 75,0 y 125,0 %. Si no más de dos resultados se encuentran fuera del intervalo comprendido entre 75,0 y 125,0 % realizar el ensayo con diez aerosoles adicionales. Los requisitos del ensayo se cumplen si no más de dos de los veinte resultados se encuentran fuera del intervalo comprendido entre 75,0 y 125,0 % del peso declarado de la dosis.

Uniformidad de contenido de la dosis - La determinación del contenido del principio activo en la descarga de un aerosol dosificador puede llevarse a cabo mediante el empleo del aparato que se describe en *Aparato para toma de muestra*. El mismo, se considera apropiado para toma de muestras a caudales bajos (12,5 litros por minuto).

Aparato para toma de muestra - El aparato descripto en la *Figura 1* se emplea para obtener la muestra de una dosis a partir de un aerosol dosificador mediante el disparador de inhalación provisto por el fabricante. El aparato consta de un sistema de entrada que comprende: el disparador *A*, el adaptador de entrada *B* y el tubo de admisión *C* de aproximadamente 5 cm x 15 cm, el cual se afina a 8 mm en uno de sus extremos; un tubo colector al cual se adjunta un difusor de vidrio sinterizado de porosidad gruesa *D*; una cámara de recolección *E*, que consiste en un frasco lavador de gases que contiene una solución absorbente y un sistema de vacío que comprende: una fuente de vacío, un regulador de flujo y un caudalímetro. El adaptador de entrada se acopla perfectamente con el disparador de inhalación provisto con el aerosol. Para evitar pérdidas del principio activo cuando el aerosol se descarga, el aire se extrae continuamente, a través del sistema, a una velocidad de 12 litros por minuto.

Criterios de aceptación - El ensayo para *Uniformidad de contenido de la dosis* se especifica para los aerosoles dosificadores y los pulverizadores dosificadores (no presurizados).

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, aplicar los criterios de aceptación dados para *aerosoles dosificadores* en *<740>. Uniformidad de unidades de dosificación*.

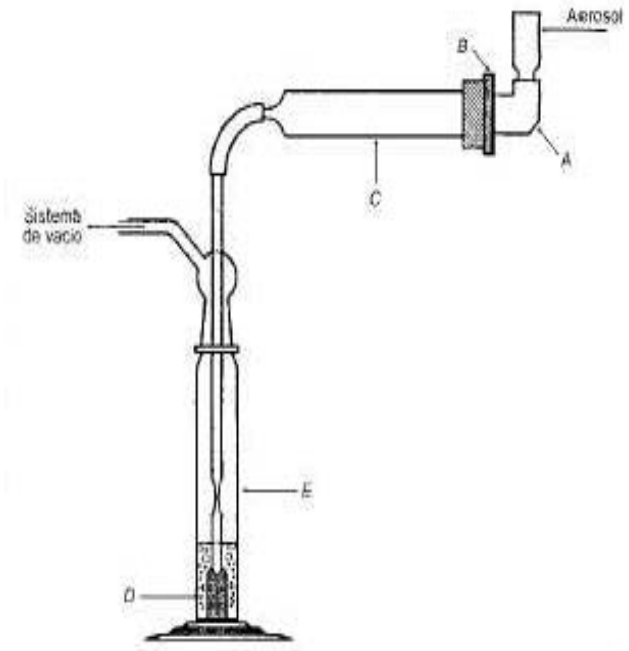


Figura 1. Aparato para toma de muestra de aerosoles dosificadores

Tamaño de partícula –

La distribución del tamaño de partículas y gotas en el rocío descargado por los aerosoles dosificadores es un parámetro importante empleado para juzgar su comportamiento. Las partículas de las suspensiones, envasadas en aerosoles dosificadores, no deben ser mayores de 10 µm si deben depositarse en el pulmón durante la inhalación. Generalmente, para este caso, se micronizan a tamaños menores de 5 µm, pudiendo emplearse la técnica de *Microscopía* para evaluar el número de partículas grandes en las emisiones de estos aerosoles. Sin embargo, la *Evaluación aerodinámica del tamaño de las partículas* mediante el empleo de impactadores puede dar una idea más certera del comportamiento del aerosol. Esta determinación se realiza con el objeto de definir la fracción respirable, que es la porción de partículas que se espera penetren en los pulmones durante la inhalación de la dosis emitida.

Microscopía - Purgar la válvula de un aerosol dosificador agitando alternativamente y emitiendo varias dosis y, por último, emitir una dosis sobre un portaobjetos para microscopía, limpio y seco, desde una distancia de 5 cm a partir del extremo del disparador, perpendicular a la dirección de la pulverización. Examinar la muestra en el portaobjetos bajo un microscopio equipado con un micrómetro ocular con una magnificación de 500x. Enfocar las partículas en 25 campos distintos, cercanos al centro de impacto de la muestra y observar el tamaño de la mayoría de las partículas individuales encontradas en esos campos: deben ser menores de 5 µm a lo largo del eje mayor. Registrar el número y tamaño de todas las partículas cristalinas individuales (no aglomeradas) que sean de más de 10 µm de longitud, medidas a lo largo del eje mayor: no se deben observar más de 10 partículas de tales características.

Evaluación aerodinámica de las partículas – Los dispositivos de impacto (impactador) miden el diámetro aerodinámico. Mediante el empleo de métodos de valoración espectrofotométricos o cromatográficos apropiados y de un impactador cuidadosamente calibrado, puede determinarse la distribución aerodinámica de partículas de la muestra según su tamaño.

Impactador - El aparato descripto en la *Figura 2* se emplea para determinar la fracción de partículas finas presentes en la dosis emitida desde aerosoles dosificadores mediante los disparadores suministrados por el fabricante. Las unidades que componen el aparato mostrado en la *Figura 2* se enumeran en la *Tabla.*

La cámara de impacto inferior del aparato está diseñada de modo que, con un caudal de aire de 60 litros por minuto a través del sistema, el límite del tamaño aerodinámico efectivo de partícula que la alcanza es 6,4 µm. En la cámara de impacto superior se produce una colisión vertical del chorro de aire sobre una superficie líquida para formar un vórtice (depresión) que atrapa en forma efectiva las partículas de la muestra mayores de 6,4 µm. En la cámara de impacto superior *D* (ver *Figura 2*), se introducen los volúmenes de solventes especificados en la monografía correspondiente. La cámara de impacto inferior *H*, y las otras partes del aparato se arman de modo de asegurar que quede sostenido verticalmente en forma apropiada y que el botón espaciador del difusor *G*, apoye en el fondo de la cámara de impacto inferior *H*. Resulta sumamente importante que el adaptador para el disparador *A*, esté en la orientación correcta para que cuando se inserte la boquilla del aerosol, apunte a lo largo del eje horizontal de la garganta *B*, mientras que el eje vertical del envase presurizado, que debe estar invertido, esté en el mismo plano vertical que el aparato.

Procedimiento - Conectar una bomba al tubo de salida *F*. El caudal de aire a través del aparato, medido en la entrada a la garganta *B*, se ajusta con la bomba a 60 ± 5 litros por minuto. Purgar la válvula dosificadora del aerosol con su disparador agitando durante 30 segundos, descargando y repitiendo la secuencia de agitación y descarga una segunda vez dentro de los 5 segundos de completada la primera secuencia. Retirar el disparador y lavar las superficies internas y externas del vástago de la válvula y el disparador con un solvente apropiado. Luego que el disparador y la válvula estén completamente secos, colocar nuevamente el disparador en el envase y completar el secado con un chorro de aire. Agitar el aerosol durante aproximadamente 30 segundos, poner en funcionamiento la bomba del aparato de recolección y ubicar el disparador en el adaptador *A*. Inmediatamente después de ajustada la boquilla, descargar el aerosol una vez y separar el disparador y el envase del adaptador. Agitar la unidad durante no menos de 5 segundos, colocar nuevamente el envase en el adaptador y nuevamente descargar el aerosol. Repetir esta secuencia ocho veces más. Al cabo de un intervalo de al menos 5 segundos después de la décima descarga, apagar la bomba y desarmar el aparato. Empleando un solvente apropiado, lavar la superficie interna del tubo *E*, y la superficie externa del tubo que queda en el interior de la cámara inferior, recolectando los lavados en la cámara inferior. Transferir el contenido de la cámara inferior *H*, a un matraz aforado, lavar la cámara inferior con un solvente apropiado, agregando el lavado al matraz y diluir a volumen con el mismo solvente, a menos que se especifique otro en la monografía correspondiente. Empleando el método de análisis especificado en la monografía correspondiente, determinar la cantidad de principio activo en esta solución. Calcular la cantidad de principio activo recolectado en la cámara de impacto inferior y expresar los resultados como una fracción o porcentaje (*Fracción respirable* o *Porcentaje respirable*, respectivamente) del resultado promedio obtenido en la determinación de *Uniformidad de contenido de unidades de pulverización*. El Porcentaje respirable cumple con los requisitos declarados en la monografía correspondiente.

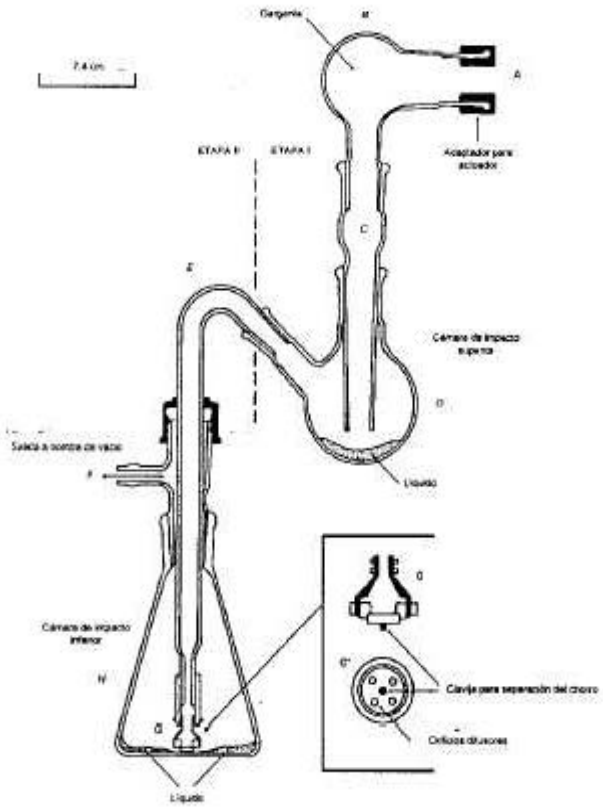


Figura 2. Impactador.

Tabla. Componentes del impactador (ver *figura 2*).

Código	Elemento	Descripción	Dimensiones (mm)*
A	Adaptador para disparador	Adaptador de caucho modelado para la unión con el disparador	
B	Garganta	Balón modificado	50 ml
		Entrada: junta cónica esmerilada hembra	29/32
		Salida: junta cónica esmerilada macho	24/29
C	Cuello	Adaptador de vidrio modificado	
		Entrada: junta cónica esmerilada hembra	24/29
		Salida: junta cónica esmerilada macho	24/29
		Parte inferior: tubo de vidrio calibrado: diámetro interno	14
		Tubo de vidrio de paredes delgadas: diámetro externo	17
D	Cámara de impacto superior	Balón modificado	100 ml
		Entrada: junta cónica esmerilada hembra	24/29
		Salida: junta cónica esmerilada hembra	14/23
E	Tubo de conexión	Tubo de vidrio de pared media: unión cónica esmerilada macho	14/23
		Codo y parte recta superior: diámetro exterior	13
		Parte recta inferior: diámetro exterior	8
F	Adaptador con tubuladura lateral y capuchón roscado	Capuchón roscado de plástico	28/13
		Junta de silicona	28/11

Código	Elemento	Descripción	Dimensiones (mm)*
		Arandela de politetrafluoroetileno	28/11
		Rosca de vidrio: paso de rosca	28
		Salida lateral (salida hacia la bomba de vacío): diámetro interior mínimo	11
G	Difusor	Porta-filtros modificados, de polipropileno, unido al extremo del tubo mediante un tubo de politetrafluoroetileno	Figura 2
G'		Disco circular de acetal con 4 orificios dispuestos en un círculo de 5,3 mm de diámetro y una clavija para separación del chorro en el centro	10
		Diámetro de la clavija	2
		Altura de resalte de la clavija	2
H	Cámara de impacto inferior	Erlenmeyer	250 ml
		Junta cónica esmerilada hembra	24/29

*Las medidas de las juntas esmeriladas corresponden a las designadas por ISO (internacional Organization for Standarization).

400. ENSAYOS FARMACOTÉCNICOS PARA SUPOSITORIOS

Los supositorios deben cumplir con los siguientes ensayos:

Peso promedio - El peso promedio debe cumplir con las especificaciones de la *Tabla*.

Tabla.

Peso promedio de los supositorios (g)	Límite de desviación del peso promedio (%)
< 1,5	± 10
≥ 1,5 y ≤ 2,5	± 7,5
> 2,5	± 5

Uniformidad de contenido - (ver *740. Uniformidad de unidades de dosificación*.)

Temperatura de fusión de supositorios con excipientes liposolubles - Es la temperatura a la cual el supositorio funde, con un intervalo de fusión bien definido.

Aparato - Emplear el dispositivo descripto en la *Figura*, constituido por un tubo de vidrio con forma de pipeta cuya parte superior, más estrecha, está graduada, y en cuya parte central ensanchada se encuentra soldada una varilla de vidrio espiralada, con disposición cónica y destinada a alojar al supositorio con la punta hacia el vértice del cono. El conjunto está dentro de un recipiente de vidrio que actúa como baño de agua de temperatura regulada, de diámetro suficiente para contener el tubo. El nivel de agua debe llegar al extremo superior de la escala graduada en el tubo y la fusión se determina mediante la observación del ascenso de la grasa fundida en la misma.

Procedimiento - [NOTA: antes de proceder con el ensayo, el supositorio debe permanecer durante 24 horas a temperatura ambiente.]

Transferir el supositorio a la varilla de vidrio espiralada, con el extremo afilado hacia arriba; tapar el extremo superior del tubo para sostener el supositorio e introducir el conjunto en el baño termostatizado, manteniéndolo en posición vertical mediante un soporte con agarradera. Hacer circular agua caliente entre 27 y 28 °C, hasta que alcance la marca cero de la escala. Cuando la temperatura se haya estabilizado en el sistema, aumentar un grado. Una vez estabilizado a la nueva temperatura, mantener durante 10 minutos, al cabo de los cuales se aumenta otro grado, y así sucesivamente hasta la fusión del supositorio.

Si debido a su composición el supositorio no se funde a la temperatura de ensayo fijada, se aprecia el grado de ablandamiento de éste probando con un alambre de metal en determinados períodos de tiempo. En todos los casos, el supositorio debe fundirse o disgregarse a una temperatura no menor de 34 °C ni mayor de 37 °C.

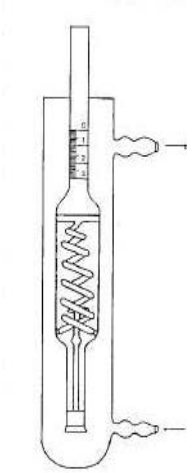


Figura. Aparato para la determinación de la temperatura y tiempo de fusión de supositorios.

Tiempo de fusión de supositorios con excipientes liposolubles - Es el tiempo que tarda en fundir el supositorio a una temperatura constante de 37 ± 0,5 °C.

Aparato - Emplear el aparato indicado en la *Figura.*

Procedimiento - Proceder según se indica en *Temperatura de fusión de supositorios con excipientes liposolubles*, pero a una temperatura constante de 37 ± 2 °C. Una vez estabilizada dicha temperatura, transferir el supositorio a la varilla de vidrio espiralada y a partir de ese momento medir el tiempo hasta que se produzca la fusión completa. El tiempo o intervalo de fusión no debe ser mayor de 20 minutos.

Tiempo de disolución o disgregación de supositorios con excipientes hidrosolubles - Es el tiempo que tarda el supositorio en disolverse o disgregarse a una temperatura constante de 37 ± 0,5 °C.

Procedimiento - Proceder según se indica para *Comprimidos no recubiertos* en *<310>. Ensayo de disgregación*, reemplazando la malla metálica por otra malla N° 16 sin emplear discos. Transcurridos 40 minutos o el tiempo especificado en la monografía correspondiente, levantar la cesta del líquido y observar los supositorios: todos ellos deben disolverse o disgregarse completamente. Si sólo uno de los supositorios no se disgrega completamente, repetir el ensayo con seis

supositorios adicionales: los supositorios cumplen con el ensayo si todos los supositorios adicionales se disuelven o disgregan completamente.

410. ENSAYOS GENERALES DE IDENTIFICACIÓN

En este capítulo se establecen los ensayos que, con frecuencia, la Farmacopea emplea en la identificación de productos oficiales.

[NOTA: estos ensayos no son aplicables a mezclas, salvo que se especifique en la monografía correspondiente.]

Acetato - Cuando el ácido acético o los acetatos se calientan con unas gotas de ácido sulfúrico concentrado y alcohol, se forma acetato de etilo que puede identificarse por su olor característico. Con soluciones neutras de acetatos, el cloruro férrico (SR) produce un intenso color rojo que desaparece con el agregado de ácidos minerales.

Aluminio - La combinación de soluciones de sales de aluminio con hidróxido de amonio 6 N produce un precipitado blanco gelatinoso insoluble en exceso de dicho hidróxido. El hidróxido de sodio 1 N o el sulfuro de sodio (SR) producen el mismo precipitado que se disuelve en exceso de cualquiera de dichos reactivos.

Amonio - Las sales de amonio se descomponen con la adición de un exceso de hidróxido de sodio 1 N, desprendiendo amoníaco que se identifica por su olor característico o por la reacción alcalina del papel de tornasol húmedo expuesto a los vapores amoniacales. Calentando la solución se acelera la descomposición.

Antimonio - Las soluciones de compuestos de antimonio (III) fuertemente acidificadas con ácido clorhídrico y en presencia de sulfuro de hidrógeno producen un precipitado naranja de sulfuro de antimonio, insoluble en hidróxido de amonio 6 N pero soluble en sulfuro de amonio (SR).

Bario - Las sales de bario forman un precipitado blanco con ácido sulfúrico 2 N que es insoluble en ácido clorhídrico o nítrico. Las sales de bario confieren un color verde amarillento a una llama no luminosa, la cual se ve de color azul cuando se la mira a través de un vidrio verde.

Benzoato - Las soluciones neutras de benzoatos forman un precipitado color salmón con cloruro férrico (SR). En soluciones moderadamente concentradas, se observa un precipitado de ácido benzoico por la acidificación del medio con ácido sulfúrico 2 N. El precipitado se disuelve fácilmente en éter.

Bicarbonato - Ver *Carbonato.*

Bismuto - Las sales de bismuto disueltas en un ligero exceso de ácido nítrico o ácido clorhídrico, forman un precipitado blanco al diluirse con agua que adquiere color marrón en presencia de sulfuro de hidrógeno. El compuesto resultante se disuelve en una mezcla caliente de partes iguales de ácido nítrico y agua (1:1).

Bisulfito - Ver *Sulfito*.

Borato - Cuando a 1 ml de una solución de borato, previamente acidificada con ácido clorhídrico frente al papel de tornasol, se le agrega 3 ó 4 gotas de una solución saturada de lodo y 3 ó 4 gotas de una solución de alcohol polivinílico 1 en 50 se produce un color azul intenso. Si una solución de borato se trata con ácido sulfúrico y se agrega metanol, la solución arde con una llama de borde verde.

Bromuro - Cuando a las soluciones de bromuros se les agrega cloro (SR) gota a gota, liberan bromo que se disuelve en cloroformo por agitación, coloreándolo de color rojo o castaño rojizo. El nitrato de plata (SR) con soluciones de bromuros forma un precipitado blanco amarillento insoluble en ácido nítrico y ligeramente soluble en hidróxido de amonio 6 N.

Calcio - Las soluciones de sales de calcio forman oxalatos insolubles cuando se las trata del siguiente modo: a una solución de una sal de calcio 1 en 20, agregar 2 gotas de rojo de metilo (SR) y neutralizar con hidróxido de amonio 6 N. Agregar, gota a gota, ácido clorhídrico 3 N, hasta acidez frente al indicador. Agregar oxalato de amonio (SR) para formar un precipitado blanco insoluble en ácido acético 6 N pero soluble en ácido clorhídrico. Las sales de calcio humedecidas con ácido clorhídrico producen un color rojo amarillento transitorio cuando son expuestas a la llama no luminosa.

Carbonato - Los carbonatos y bicarbonatos producen efervescencia con ácidos, desprendiendo un gas incoloro que burbujeado en hidróxido de calcio (SR) produce un precipitado blanco inmediatamente. Una solución fría de carbonato soluble se colorea de rojo en presencia de fenolftaleína (SR) mientras que el bicarbonato permanece incoloro o ligeramente coloreado en presencia del mismo indicador.

Cinc - Las sales de cinc en solución, en presencia de acetato de sodio forman un precipitado blanco con sulfuro de hidrógeno, insoluble en ácido acético pero soluble en ácido clorhídrico 3 N. Las

sales de cinc en solución, con sulfuro de amonio (SR) en medio alcalino o neutro forman un precipitado blanco, con las mismas características que el arriba mencionado. En presencia de ferrocianuro de potasio (SR) forman un precipitado blanco insoluble en ácido clorhídrico 3 N.

Citrato - A 15 ml de piridina agregar unos mg de citrato, disuelta o suspendida en 1 ml de agua y agitar. A esta mezcla agregar 5 ml de anhídrido acético y agitar: se observa un ligero color rojo.

Clorato - Las soluciones de cloratos no forman precipitados con nitrato de plata (SR). El agregado de ácido sulfuroso a esta mezcla produce un precipitado blanco insoluble en ácido nítrico pero soluble en hidróxido de amonio 6 N. Después de la ignición se reducen a cloruros que son identificados por los ensayos correspondientes (ver *Cloruros*). Los cloratos secos en presencia de ácido sulfúrico concentrado, crepitan y desprenden un gas amarillo verdoso. Precaución: emplear pequeñas cantidades de clorato y realizar este ensayo con extremo cuidado.

Cloruro - Las soluciones de cloruros con nitrato de plata (SR) producen un precipitado blanco cremoso, insoluble en ácido nítrico pero soluble en ligero exceso de hidróxido de amonio 6 N. Cuando se ensayan clorhidratos de alcaloides, que no responden al ensayo anterior, agregar una gota de ácido nítrico diluido y 0,5 ml de nitrato de plata (SR) a una solución de la sustancia a ensayar que contenga 2 mg de ión cloruro: se forma un precipitado blanco. Centrifugar la mezcla y descartar el líquido sobrenadante. Lavar con tres porciones de 1 ml de ácido nítrico diluido 1 en 100 y descartar los lavados procediendo rápidamente. Al agregar amoníaco (SR), gota a gota, el precipitado se disuelve fácilmente. Los cloruros secos mezclados en partes iguales con dióxido de manganeso impregnados con ácido sulfúrico y calentados levemente desprenden cloro reconocible por la producción de un color azul frente al papel de ioduro impregnado con almidón.

Cobalto - Las soluciones de sales de cobalto 1 en 20 en ácido clorhídrico 3 N mezcladas en volúmenes iguales con una solución caliente recién preparada de 1-nitroso-2-naftol 1 en 10 en ácido acético 9 N, producen un precipitado rojo cuando se calienta la mezcla en un baño de vapor. Las soluciones de sales de cobalto saturadas con cloruro de potasio y tratadas con nitrito de potasio y ácido acético producen un precipitado amarillo.

Cobre - Las soluciones de compuestos cúpricos acidificadas con ácido clorhídrico depositan una película roja de cobre metálico sobre una superficie de hierro pulida. Las sales cúpricas en presencia de exceso de hidróxido de amonio 6 N producen, en un principio, un precipitado azulado que se redisuelve y luego produce una solución de color azul intenso. Las sales cúpricas en presencia de ferrocianuro de potasio (SR), producen un precipitado color pardo rojizo insoluble en ácidos diluidos.

Fosfato - [NOTA: cuando la monografía indique, ensayo de identificación *Fosfato*, emplear los ensayos para *ortofosfatos*, a menos que se especifique el uso de ensayos para *pirofosfatos* o que el producto deba ser calcinado antes de llevar a cabo el ensayo.]

Ortofosfatos – Las soluciones neutras de ortofosfatos con nitrato de plata (SR), forman un precipitado amarillo soluble en ácido nítrico 2 N y en hidróxido de amonio 6 N. En presencia de molibdato de amonio (SR) se forma un precipitado amarillo soluble en hidróxido de amonio 6 N.

Pirofosfatos - Los pirofosfatos obtenidos por calcinación producen un precipitado blanco con nitrato de plata (SR) soluble en ácido nítrico 2 N y en hidróxido de amonio 6 N. Con molibdato de amonio (SR) los pirofosfatos forman un precipitado amarillo soluble en hidróxido de amonio 6 N.

Hierro - Los compuestos férricos y ferrosos en solución producen un precipitado negro con sulfuro de amonio (SR) que se disuelve en presencia de ácido clorhídrico 3 N en frío con desprendimiento de sulfuro de hidrógeno.

Sales férricas - Las soluciones de sales férricas en medio ácido con ferrocianuro de potasio (SR) producen un precipitado azul oscuro. En exceso de hidróxido de sodio 1 N se forma un precipitado marrón rojizo. Las sales férricas en solución en presencia de tiocianato de amonio (SR) producen un color rojo intenso que no desaparece con el agregado de ácidos minerales diluidos.

Sales ferrosas - Las soluciones de sales ferrosas con ferricianuro de potasio (SR) producen un precipitado azul oscuro insoluble en ácido clorhídrico 3 N que se descompone en presencia de hidróxido de sodio 1 N. Las soluciones de sales ferrosas en presencia de hidróxido de sodio 1 N producen un precipitado blanco grisáceo que cambia rápidamente a verde y luego, cuando se agita, toma un color marrón.

Hipofosfito - Las soluciones de hipofosfitos en presencia de cloruro mercúrico (SR) producen un precipitado blanco que se torna gris frente a un exceso de hipofosfitos. Las soluciones de hipofosfitos acidificadas con ácido sulfúrico y calentadas con sulfato cúprico (SR) forman un precipitado rojo.

Ioduro - La adición a una solución de ioduro de cloro (SR), gota a gota, libera iodo que colorea la solución de amarillo a rojo. Si esta solución se agita con cloroformo, la capa clorofórmica se colorea de violeta. Si a la solución inicial, en lugar de cloroformo se le agrega almidón (SR), se colorea de azul, que por calentamiento se decolora.

Lactato – Las soluciones de lactatos acidificadas con ácido sulfúrico, mezcladas con permanganato de potasio (SR) y calentadas, desprenden acetaldehído que puede reconocerse poniendo los vapores en contacto con un papel de filtro impregnado con una mezcla recientemente preparada de volúmenes iguales de solución acuosa de morfolina al 20 % y nitroferricianuro de sodio (SR): se produce color azul.

Litio - Las sales de litio en soluciones moderadamente concentradas en medio alcalino de hidróxido de sodio, con carbonato de sodio (SR) producen un precipitado blanco cuando son llevadas a ebullición. El precipitado es soluble en cloruro de amonio (SR). Las sales de litio humedecidas con ácido clorhídrico producen un color carmesí (rojo grana) intenso a la llama. Las soluciones de sales de litio no precipitan en ácido sulfúrico 2 N o sulfatos solubles (diferencia con el estroncio).

Magnesio - Las soluciones de sales de magnesio en presencia de cloruro de amonio, con carbonato de amonio (SR) no precipitan al neutralizarse, pero la adición de fosfato dibásico de sodio (SR) produce un precipitado blanco cristalino insoluble en hidróxido de amonio 6 N.

Manganeso - Las soluciones de sales manganosas con sulfuro de amonio (SR) producen un precipitado color salmón soluble en ácido acético.

Mercurio - Las soluciones de sales de mercurio libres de ácido nítrico en exceso producen un depósito gris sobre una lámina de cobre bien pulida y brillante, que al frotarse adquiere un aspecto plateado brillante. Las soluciones de compuestos mercuriales con sulfuro de hidrógeno, producen un precipitado negro insoluble en sulfuro de amonio (SR) y en ácido nítrico 2 N en ebullición.

Sales mercúricas - Las soluciones de sales mercúricas producen un precipitado amarillo con hidróxido de sodio 1 N o un precipitado escarlata con solución de ioduro de potasio (SR) muy soluble en exceso de reactivo.

Sales mercuriosas - Los compuestos mercuriosos se descomponen en hidróxido de sodio 1 N produciendo un color negro o, en presencia de ácido clorhídrico, un precipitado blanco que se ennegrece con el agregado de hidróxido de amonio 6 N. Las mismas sales en presencia de ioduro de potasio (SR) producen un precipitado amarillo que, con el tiempo, se torna verde.

Nitrato - A una solución de nitrato se le agrega igual volumen de ácido sulfúrico y se enfría. Cuando se agrega a la misma sin mezclar una solución de sulfato ferroso se desarrolla un anillo color marrón entre los dos líquidos. Cuando los nitratos son calentados en ácido sulfúrico concentrado y cobre metálico desprende vapores de color rojo castaño. Los nitratos no decoloran el permanganato de potasio (SR) en medio ácido (diferencia con los nitritos).

Nitrito - Los nitritos tratados con ácidos minerales diluidos o ácido acético 6 N desprenden vapores rojo marrón. Las soluciones de nitritos colorean de azul el papel de ioduro impregnado con almidón.

Oxalato - Las soluciones neutras o alcalinas de oxalatos con cloruro de calcio (SR), forman un precipitado blanco insoluble en ácido acético 6 N pero soluble en ácido clorhídrico. Las soluciones de oxalatos acidificadas y a 80 °C decoloran la solución de permanganato de potasio (SR).

Permanganato - Las soluciones de permanganatos en medio sulfúrico se decoloran en presencia de peróxido de hidrógeno (SR), de bisulfito de sodio (SR) en frío y de ácido oxálico (SR) a 80 °C.

Peróxido - Las soluciones de peróxidos acidificadas ligeramente con ácido sulfúrico, con la adición de dicromato de potasio (SR) producen un intenso color azul. Si la solución se agita con éter el color azul pasa a la capa etérea.

Plata - Las sales de plata en solución, en presencia de ácido clorhídrico, forman un precipitado blanco cremoso insoluble en ácido nítrico y soluble en hidróxido de amonio 6 N. Las soluciones de sales de plata a las que se les agrega hidróxido de amonio 6 N y una pequeña cantidad de formaldehído (SR) forman un espejo de plata en las paredes del tubo. Esta solución debe eliminarse porque se forma amiduro de plata que es un explosivo espontáneo.

Plomo - Las soluciones de sales de plomo en ácido sulfúrico 2 N producen un precipitado blanco insoluble en ácido clorhídrico 3 N o ácido nítrico 2 N pero soluble en hidróxido de sodio 1 N y en acetato de amonio (SR). Las soluciones de sales de plomo en medio neutro o ligeramente acidificadas con ácidos minerales, con cromato de potasio (SR) producen un precipitado amarillo insoluble en ácido acético 6 N pero soluble en hidróxido de sodio 1 N.

Potasio - Los compuestos de potasio confieren a la llama un color violeta, que es enmascarado por pequeñas cantidades de sodio a menos que se discrimine a través de un cristal de cobalto. Las sales de potasio en soluciones neutras concentradas o moderadamente concentradas (dependiendo de la solubilidad y contenido de potasio), con bitartrato de sodio (SR) producen un precipitado blanco cristalino soluble en hidróxido de amonio 6 N y en soluciones alcalinas de hidróxidos y carbonatos. La formación del precipitado es generalmente lenta, pero puede acelerarse por agitación o raspado de las paredes internas del tubo de ensayo o por el agregado de pequeñas cantidades de ácido acético glacial o alcohol.

Salicilato - Las soluciones moderadamente diluidas de salicilatos en presencia de cloruro férrico (SR) producen un color violeta. La adición de ácidos a las soluciones moderadamente concentradas de salicilatos produce un precipitado blanco cristalino de ácido salicílico que funde entre 158 y 161 °C.

Sodio - Preparar una solución que contenga 0,1 g de compuesto de sodio en 2 ml de agua, agregar 2 ml de carbonato de potasio al 15 % y calentar hasta ebullición: no se forma precipitado. Agregar 4 ml de piroantimoniato de potasio (SR) y calentar hasta ebullición. Dejar enfriar en agua con hielo y, si fuera necesario, raspar las paredes internas del tubo con una varilla de vidrio: se forma un precipitado denso. Las sales de sodio confieren un intenso color amarillo a la llama.

Sulfato - Las soluciones de sulfatos en presencia de cloruro de bario (SR) producen un precipitado blanco insoluble en ácido clorhídrico y ácido nítrico. Con acetato de plomo (SR) forman un precipitado blanco soluble en solución de acetato de amonio. El ácido clorhídrico no produce precipitado cuando se agrega a las soluciones de sulfatos (diferencia con tiosulfatos).

Sulfito - Los sulfitos y bisulfitos tratados con ácido clorhídrico 3 N desprenden dióxido de azufre reconocible por su olor pungente característico y porque ennegrece el papel de filtro impregnado con una solución de nitrato mercurioso (SR).

Tartrato - Disolver unos mg de tartrato con 2 gotas de una solución de periodato de sodio 1 en 20 y acidificar con 1 gota de ácido sulfúrico 1 N. Dejar en reposo durante 5 minutos y agregar algunas gotas de ácido sulfuroso seguido de unas gotas de fucsina-ácido sulfuroso (SR): aparece un color rosado rojizo a los 15 minutos.

Tiocianato - Las soluciones de tiocianatos en presencia de cloruro férrico (SR) producen un color rojo que no desaparece con el agregado de soluciones moderadamente concentradas de ácidos minerales.

Tiosulfato - Las soluciones de tiosulfatos en medio clorhídrico forman un precipitado blanco que cambia al amarillo rápidamente con desprendimiento de dióxido de azufre identificable por su olor característico. El agregado de cloruro férrico (SR) a las soluciones de tiosulfatos produce un color violeta intenso que desaparece rápidamente.

415. ENSAYO PARA AGENTES EXTRAÑOS EN VACUNAS VIRALES

Ver *415. Ensayo para agentes extraños en Vacunas Virales* en *Apartado de Vacunas* en *Volumen III.*

Actualización parcial

420. ENVASES PRIMARIOS DE PLÁSTICO

En este capítulo se describen los ensayos que deben cumplir los envases plásticos de uso farmacéutico, incluyendo los envases destinados a sangre y hemoderivados, así como también las materias primas con las cuales se fabrican.

Los polímeros generalmente empleados para la fabricación de envases son el polietileno (de baja y alta densidad), el polipropileno, el poli(cloruro de vinilo), el terftalato de polietileno y copolímeros de etileno y acetato de vinilo.

La naturaleza y la cantidad de los aditivos está determinada por el tipo de polímero, el proceso empleado para la construcción del envase y el uso para el cual el mismo está destinado. Los aditivos pueden ser antioxidantes, estabilizantes, plastificantes, lubricantes, colorantes, modificadores de impacto, etc. Los agentes antiestáticos y desmoldantes pueden emplearse únicamente en aquellos envases que serán destinados a preparaciones de uso oral o externo. Para cada tipo de material descripto en este capítulo se indican los aditivos aceptados.

El envase plástico elegido para cualquier preparación debe ser tal que, los componentes del producto, que están en contacto con el material plástico no sean significativamente adsorbidos sobre su superficie y no se produzcan migraciones desde las paredes del envase. De la misma manera, el material del envase no debe ceder cantidades apreciables de ninguna sustancia que pueda afectar la estabilidad de la preparación o presentar un riesgo de toxicidad. A fin de confirmar la compatibilidad del envase con el contenido y para asegurar que no se produzcan cambios perjudiciales en cuanto a la calidad de la preparación, se describen diversos ensayos tales como la comprobación de la ausencia de cambios en las características físicas; la evaluación de cualquier pérdida o ganancia de materia debido a la permeabilidad del envase; la detección de cambios de pH; la evaluación de cambios ocasionados por la luz; ensayos químicos y, si así se requiere, ensayos biológicos.

MATERIALES EMPLEADOS PARA FABRICACIÓN DE ENVASES PLÁSTICOS

Los materiales que se describen a continuación se emplean para la fabricación de envases para uso farmacéutico.

Poli(cloruro de vinilo) plastificado para envases destinados a sangre humana y hemoderivados y para envases destinados a soluciones acuosas para perfusión intravenosa

Los materiales a base de poli(cloruro de vinilo) plastificado contienen diversos aditivos, además del polímero de alto peso molecular obtenido por polimerización de cloruro de vinilo.

Los materiales a base de poli(cloruro de vinilo) plastificado para envases destinados a contener sangre humana y hemoderivados y envases para soluciones acuosas para perfusión intravenosa se definen por la naturaleza y las proporciones de las sustancias empleadas en su fabricación.

Contienen no menos de 55 % de poli(cloruro de vinilo) y pueden contener los siguientes aditivos:

LÍMITES DE ADITIVOS

ADITIVOS	LÍMITES (%)
ftalato de bis(2-etilhexilo)	40
octanoato de cinc (2-etilhexanoato de cinc)	1
estearato de calcio o estearato de cinc o una mezcla de ambos	1
N,N′-diaciletilendiaminas (acil significa en particular palmitil y estearil)	1
no más de uno de los siguientes aceites epoxidados o una mezcla de ambos:	10
• aceite de soja epoxidado en el cual el contenido de oxígeno oxiránico es 6 a 8 % y el índice de iodo no es mayor a 6.	
• Aceite de semilla de lino epoxidado en el cual el contenido de oxígeno oxiránico no es mayor de 10 % y el índice de yodo no es mayor de 7	

Ningún aditivo antioxidante debe agregarse al polímero. Cuando se agregan colorantes, sólo se puede agregar azul ultramarino. No se debe agregar ningún colorante al poli(cloruro de vinilo) destinado a la fabricación de envases para sangre y hemoderivados.

CARACTERÍSTICAS

Polvo, perlas, gránulos o láminas translúcidas de espesor variable, incoloras o de color amarillo pálido.

IDENTIFICACIÓN - [NOTA: si es necesario, cortar el material a ensayar en trozos de tamaño apropiado.]

A 2,0 g del material a ensayar agregar 200 ml de éter libre de peróxidos y calentar a reflujo durante 8 horas. Separar el residuo (*B*) y la solución (*Solución A*) por filtración.

Evaporar la *Solución A* a sequedad bajo presión reducida en un baño de agua a 30 °C. Disolver el residuo en 10 ml de tolueno (*Solución* A_1). Disolver el residuo *B* en 60 ml de dicloruro de etileno, calentando en un baño de agua a reflujo y filtrar. Agregar la solución gota a gota y con agitación enérgica a 600 ml de heptano calentando a una temperatura menor a la temperatura de ebullición. Filtrar la mezcla en caliente a través de un filtro caliente para separar el material insolubilizado (B_1) de la solución orgánica. Dejar enfriar, separar el precipitado (B_2) formado y filtrar a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media, previamente pesado.

A - Absorción infrarroja <460>. Disolver el material insolubilizado B_1 en 30 ml de tetrahidrofurano y agregar, en pequeñas porciones con agitación, 40 ml de etanol. Separar el precipitado (B_3) por filtración y secar al vacío a una temperatura no mayor de 50 °C sobre pentóxido de fósforo o cloruro de calcio anhidro. Disolver unos pocos mg del precipitado B_3 en 1 ml de tetrahidrofurano. Colocar algunas gotas de la solución obtenida sobre una placa de cloruro de sodio y evaporar a sequedad entre 100 y 105 °C. Registrar el espectro de absorción infrarroja y comparar con el espectro obtenido con poli(cloruro de vinilo) SR-FA.

B - Aplicar la siguiente técnica cromatográfica.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno.

Solución estándar - Disolver 0,8 g de ftalato de bis(2-etilhexilo) SR-FA en tolueno y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución muestra - *Solución* A_1.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 5 µl de cada solución. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartos de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejarla secar. Examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm. El valor de R_f e intensidad de la mancha obtenida a partir de la *Solución muestra* debe ser similar a la obtenida a partir de la *Solución estándar*.

C – Absorción infrarroja <460> - Examinar el residuo obtenido en el ensayo para *Ftalato de bis(2-etilhexilo)* comparando con el espectro obtenido con Ftalato de bis(2-etilhexil) SR-FA.

ENSAYOS –

Solución indicadora - Disolver en alcohol 100 mg de azul de bromotimol, 20 mg de rojo de metilo y 200 mg de fenolftaleína. Diluir a 100 ml con el mismo solvente y filtrar.

Solución S_1 - Transferir 5,0 g del material a ensayar a una cápsula. Agregar 30 ml de ácido sulfúrico y calentar hasta obtener una masa viscosa negra. Enfriar y agregar con precaución 10 ml de solución de peróxido de hidrógeno al 30 % y calentar suavemente. Dejar enfriar y agregar 1 ml de solución de peróxido de hidrógeno al 30 %, repetir el agregado y evaporación de la solución de peróxido de hidrógeno al 30 % hasta obtener un líquido incoloro. Reducir el volumen hasta 10 ml. Enfriar y diluir a 50,0 ml con agua.

Solución S_2 - Transferir 25 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato. Agregar 500 ml de *Agua para Inyectables* y cubrir la boca del erlenmeyer con un vaso de precipitados de vidrio al borosilicato. Calentar en autoclave a 121 ± 2 °C durante 20 minutos. Dejar enfriar y decantar la solución. Diluir la solución a 500 ml.

Aspecto de la solución S_2 - Debe ser transparente e incolora.

Acidez o alcalinidad - A 100 ml de *Solución* S_2, agregar 0,15 ml de *Solución indicadora*. No se deben requerir más de 1,5 ml de hidróxido de sodio 0,01 N para cambiar el color del indicador a azul. A 100 ml de *Solución* S_2, agregar 0,2 ml de naranja de metilo (SR). No se debe requerir más de 1,0 ml de ácido clorhídrico 0,01 N para iniciar el cambio de color del indicador de amarillo a anaranjado.

Absorbancia - Evaporar 100 ml de *Solución* S_2 a sequedad. Disolver el residuo en 5 ml de hexano. Entre 250 y 310 nm la absorbancia no debe ser mayor de 0,25.

Sustancias reductoras - Efectuar el ensayo dentro de las 4 horas de preparada la *Solución* S_2. A 20,0 ml de *Solución* S_2 agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20,0 ml de permanganato de potasio 0,002 M. Calentar a reflujo durante 3 minutos y enfriar inmediatamente. Agregar 1 g de ioduro de potasio y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR)

como indicador. Realizar una determinación con un blanco empleando 20 ml de *Agua para Inyectables* y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre los volúmenes consumidos no debe ser mayor de 2,0 ml.

Aminas aromáticas primarias –

Solución muestra - A 2,5 ml de *Solución A_1* obtenida en la *Identificación*, agregar 6 ml de agua y 4 ml de ácido clorhídrico 0,1 M. Agitar vigorosamente y descartar la fase orgánica. A la fase acuosa agregar 0,4 ml de una solución de nitrito de sodio al 1 % recientemente preparada. Mezclar y dejar en reposo durante 1 minuto. Agregar 0,8 ml de una solución de sulfamato de amonio al 2,5 %, dejar en reposo durante 1 minuto y agregar 2 ml de una solución de diclorhidrato de *N*-(1-Naftil)etilendiamina al 0,5 %. [NOTA: realizar el ensayo a bajas temperaturas.]

Solución estándar - Proceder según se indica para la *Solución muestra*, reemplazando la fase acuosa por una mezcla de 1 ml de una solución de naftilamina 0,001 % en ácido clorhídrico 0,1 M, 5 ml de agua y 4 ml de ácido clorhídrico 0,1 M (20 ppm).

Después de 30 minutos, el color de la *Solución muestra* no debe ser más intenso que el de la *Solución estándar* preparada al mismo tiempo.

***N,N'*-diaciletilendiaminas** - Lavar con etanol el precipitado B_2 obtenido en la *Identificación* y contenido en el filtro de vidrio sinterizado previamente pesado. Secar hasta peso constante sobre pentóxido de fósforo y pesar el filtro. El precipitado no debe pesar más de 20 mg.

Aceites epoxidados –

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía de 1 mm de espesor.

Fase móvil - Tolueno.

Procedimiento - Aplicar sobre la placa, en forma de banda de 30 mm por 3 mm, 0,5 ml de *Solución A_1* obtenida en la *Identificación*. Dejar secar la aplicación y desarrollar el cromatograma hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartos de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente. Secar la placa cuidadosamente. Exponer la placa a vapores de iodo durante 5 minutos. Examinar el cromatograma y localizar la banda con un R_f de 0 y, si estuviera presente, la banda secundaria con un R_f de aproximadamente 0,7, ambas correspondientes a aceites epoxidados. Remover el área del gel de sílice que corresponde a la banda o bandas. En forma similar remover un área de gel de sílice para preparar un blanco. Separadamente agitar ambas muestras durante 15 minutos con 40 ml de metanol. Filtrar y evaporar a sequedad. Pesar los dos residuos. La diferencia entre los pesos no debe ser mayor de 10 mg.

Ftalato de bis(2-etilhexilo) - Examinar el cromatograma obtenido en el ensayo para *Aceites epoxidados* bajo luz ultravioleta a 254 nm y localizar la zona que corresponde a ftalato de bis(2-etilhexilo). Remover el área del gel de sílice que corresponde a esta zona y agitarla con 40 ml de éter. Filtrar sin pérdidas y evaporar a sequedad. El residuo obtenido no debe pesar más de 40 mg.

Cloruro de vinilo -

Sistema cromatográfico (ver *100. Cromatografía*) - Emplear un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización a la llama, y una columna de 3 m x 3 mm rellena con tierra de diatomea silanizada para cromatografía impregnada con 5 % p/p de dimetil estearilamida y 5 % p/p de polietilenglicol 400. Mantener la columna, el inyector y el detector a aproximadamente 45, 100 y 150 °C, respectivamente. Se emplea nitrógeno como gas transportador con un caudal de aproximadamente 30 ml por minuto.

Solución del estándar interno - Empleando una microjeringa, transferir 10 µl de éter en 20,0 ml de *N,N*-Dimetilacetamida, sumergiendo la punta de la aguja en el solvente. Inmediatamente antes de usar, diluir la solución 1 en 1.000 con *N,N*-Dimetilacetamida.

Solución madre del estándar de cloruro de vinilo - Preparar bajo una campana extractora. Transferir 50,0 ml de *N,N*-Dimetilacetamida a un recipiente de 50 ml, tapar el recipiente y pesar a la décima de mg. Llenar una jeringa de 50 ml de polietileno o polipropileno con cloruro de vinilo gaseoso, dejar que el gas este en contacto con la jeringa aproximadamente 3 minutos, vaciar la jeringa y llenar nuevamente con 50 ml de cloruro de vinilo gaseoso. Adaptar una aguja hipodérmica a la jeringa y reducir el volumen de gas en la jeringa hasta 25 ml. Inyectar estos 25 ml de cloruro de vinilo lentamente en el recipiente y agitarlo suavemente evitando el contacto entre el líquido y la aguja. Pesar el recipiente nuevamente, el aumento de peso es de aproximadamente 60 mg (1 µl de la solución así obtenida contiene aproximadamente 1,2 µg de cloruro de vinilo).

Solución estándar de cloruro de vinilo - A 1 volumen de *Solución madre del estándar de cloruro de vinilo* agregar 3 volúmenes de *N,N*-Dimetilacetamida.

Soluciones estándar - Transferir 10,0 ml de *Solución del estándar interno* a cada uno de seis recipientes de 50 ml. Cerrar los recipientes. Inyectar 1;

2; 3; 5 y 10 µl, respectivamente, de *Solución estándar de cloruro de vinilo* en cinco de los recipientes. Las seis soluciones así obtenidas contienen respectivamente, 0 µg; aproximadamente 0,3; 0,6; 0,9; 1,5 y 3 µg de cloruro de vinilo. Agitar, evitando el contacto entre el tapón y el líquido. Colocar los recipientes en un baño de agua a 60 ± 1 °C durante 2 horas.

Solución muestra - Transferir 1,0 g del material a ensayar a un recipiente de 50 ml y agregar 10,0 ml de *Solución del estándar interno*. Cerrar el recipiente. Agitar, evitando el contacto entre el tapón y el líquido. Colocar el recipiente en un baño de agua a 60 ± 1 °C durante 2 horas.

Procedimiento – Inyectar por separado en el cromatógrafo 1 ml del espacio libre superior de cada recipiente, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Calcular el contenido de cloruro de vinilo. No debe estar presente más de 1 ppm de cloruro de vinilo.

Fósforo total –

Solución estándar - Mezclar 0,5 ml de una solución de fosfato monobásico de potasio que contiene 0,219 g por litro, 10 ml de agua y 25 ml de molibdovanádico (SR) y diluir a 50,0 ml con agua (100 ppm).

Solución muestra - Calcinar 0,25 g del material a ensayar en un crisol de platino con 0,2 g de carbonato de sodio anhidro y 50 mg de nitrato de potasio. Después de enfriar tomar el residuo con agua, y transferir a un matraz aforado de 50 ml. Lavar el crisol con agua, agregar los lavados al matraz, acidificar con ácido sulfúrico al 60 % p/p hasta que cese la efervescencia. Agregar 25 ml de molibdovanádico (SR) y diluir a 50,0 ml con agua.

El ensayo es válido si la coloración amarilla producida en la *Solución muestra* no es más intensa que la de la *Solución estándar*.

Bario –

Solución estándar - Mezclar 1,2 ml de una solución, preparada disolviendo 0,178 g de cloruro de bario dihidratado en 100,0 ml, diluida 1 en 20 (50 ppm de Ba); 0,8 ml de agua y 3 ml de solución de sulfato de calcio, preparada agitando 5 g de sulfato de calcio con 100 ml de agua durante 1 hora, y filtrar.

Solución muestra - Calcinar 2,0 g del material a ensayar en un crisol de sílice. Mezclar el residuo con 10 ml de ácido clorhídrico y evaporar a sequedad en un baño de agua. Tomar este residuo con dos porciones de 1 ml de agua. Filtrar y agregar 3 ml de solución de sulfato de calcio preparada agitando 5 g de sulfato de calcio con 100 ml de agua durante 1 hora y filtrar.

El ensayo es válido si la opalescencia de la *Solución muestra* no es más intensa que la de la *Solución estándar*.

Cadmio - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Disolver 0,100 g de cadmio en el menor volumen posible de una mezcla de ácido clorhídrico y agua (50:50). Diluir a 100,0 ml con ácido clorhídrico al 1 % v/v para obtener una solución de concentración conocida de 0,1 % de Cd.

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con ácido clorhídrico al 1 % v/v.

Solución muestra - Evaporar 10 ml de la *Solución* S_1 a sequedad. Tomar el residuo con 5 ml de ácido clorhídrico al 1 % v/v, filtrar y diluir el filtrado a 10,0 ml con el mismo ácido.

Procedimiento - Medir la absorbancia a 228,8 nm empleando una lámpara de cadmio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de aire-acetileno. No debe estar presente más de 0,6 ppm de Cd.

Calcio - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Inmediatamente antes de usar, diluir 1 en 10 con agua una solución preparada con 1,000 g de carbonato de calcio y 23 ml de ácido clorhídrico 1 M y diluida a 100,0 ml con agua (400 ppm de Ca).

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar*, diluida con agua.

Solución muestra - Calcinar 2,0 g del material a ensayar en un crisol de sílice. Mezclar el residuo con 10 ml de ácido clorhídrico y evaporar a sequedad en un baño de agua. Tomar este residuo con 5 ml de agua, filtrar y diluir a 25,0 ml con el mismo solvente.

Procedimiento - Medir la absorbancia a 422,7 nm empleando una lámpara de calcio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de aire-acetileno. No debe estar presente más de 0,07 % de Ca.

Metales pesados –

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Disolver 25,0 g de acetato de amonio en 25,0 ml de agua y agregar 38,0 ml de ácido clorhídrico al 25 %. Ajustar a pH 3,5 si fuera necesario, con ácido clorhídrico 2 M o con amoníaco diluido y diluir a 100 ml con agua.

Solución estándar - Proceder según se indica para la *Solución muestra* empleando una mezcla de 10 ml de *Solución estándar de plomo* diluida 1:5

(ver *590. Límite de metales pesados*) y 2 ml de la *Solución muestra*.

Solución muestra - A 10 ml de *Solución S_1* agregar 0,5 ml de fenolftaleína (SR) y luego solución concentrada de hidróxido de sodio al 42 % hasta obtener un color rosa pálido. Diluir a 25 ml con agua. A 12 ml de la solución así obtenida agregar 2 ml de *Solución reguladora de acetato pH 3,5* y mezclar. A continuación agregar 1,2 ml de tioacetamida-glicerina básica (SR) y mezclar inmediatamente.

Solución blanco - Proceder según se indica para la *Solución muestra* empleando una mezcla de 10 ml de agua y 2 ml de la *Solución muestra*.

Después de 2 minutos, la coloración parda de la *Solución muestra* no debe ser más intensa que la de la *Solución estándar*.

Estaño –

Solución muestra - A 10 ml de *Solución S_1* agregar 0,3 ml de ácido tioglicólico y 30 ml de agua. Mezclar y agregar 2 ml de una solución de lauril sulfato de sodio al 1 % y 1 ml de una solución de ditiol, recientemente preparada, que contiene 5 g/l en etanol y diluir a 50 ml con agua.

Solución madre del estándar - Disolver 0,500 g de estaño en una mezcla de 5 ml de agua y 25 ml de ácido clorhídrico, y diluir a 1 litro. Inmediatamente antes de usar transferir 1 ml de esta solución a una matraz aforado de 100 ml y diluir a volumen con ácido clorhídrico al 2,5 %v/v (5 ppm de Sn).

Solución estándar - Proceder según se indica para la *Solución muestra*, empleando 10 ml de ácido sulfúrico al 20 % v/v y 6 ml de *Solución madre del estándar*.

Después de 15 minutos, el color de la *Solución muestra* no debe ser más intenso que el de la *Solución estándar*.

Cinc - [NOTA: preparar un blanco empleando 10 ml de agua. El ensayo no es válido a menos que la fase inferior obtenida con el blanco sea de color verde.]

Solución reguladora de acetato de pH 4,4 - Disolver 136 g de acetato de sodio y 77 g de acetato de amonio en agua y diluir a 100 ml con el mismo solvente. Agregar 250,0 ml de ácido acético glacial y mezclar.

Solución muestra - Diluir 1 ml de *Solución S_1* a 100 ml con agua. A 10 ml de la solución resultante agregar 5 ml de *Solución reguladora de acetato de pH 4,4*; 1 ml de tiosulfato de sodio 0,1 M y 5,0 ml de una solución de ditizona en cloroformo que contiene 0,01 g/1 y agitar.

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad de sulfato de cinc, equivalente a 0,440 g de $ZnSO_4 . 7H_2O$, en agua. Agregar 1 ml de ácido acético y diluir a 100 ml con agua. Diluir 1 ml de esta solución a 10 ml con agua. Antes de usar diluir 1 ml de esta solución a 10 ml con agua (10 ppm de Zn).

Solución estándar - Proceder según se indica para la *Solución muestra*, empleando una mezcla de 2 ml de una *Solución madre del estándar* y 8 ml de agua (0,2 %).

Después de 2 minutos, el color violeta de la fase inferior de la *Solución muestra* no debe ser más intenso que el de la fase inferior de la *Solución estándar*.

Residuo de evaporación - Evaporar a sequedad 50 ml de *Solución S_2* en un baño de agua y secar entre 100 y 150 °C. El residuo no debe pesar más de 7,5 mg (0,3 %).

VALORACIÓN

Llevar a cabo el método de combustión (ver *60. Combustión en erlenmeyer con oxígeno*), empleando 50,0 mg del material a ensayar. Absorber los productos de combustión en 20 ml de hidróxido de sodio 1 N. A la solución obtenida agregar 2,5 ml de ácido nítrico, 10,0 ml de nitrato de plata 0,1 N, 5 ml de sulfato férrico amónico (SR) y 1 ml de ftalato de dibutilo. Titular con tiocianato de amonio 0,05 N hasta obtener un color amarillo-rojizo. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de nitrato de plata 0,1 N equivale a 6,25 mg de poli(cloruro de vinilo).

Poliolefinas

Las poliolefinas se obtienen por polimerización de etileno o propileno o por copolimerización de estas sustancias con no más de 25 % de homólogos mayores (C_4 a C_{10}) o de ácidos carboxílicos o ésteres. Ciertos materiales pueden ser mezclas de poliolefinas.

Pueden contener hasta tres antioxidantes, uno o varios lubricantes o antibloqueantes. Cuando el material debe proveer protección de la luz se le agregan agentes opacantes como el dióxido de titanio.

Este texto es aplicable a todas las poliolefinas empleadas para propósitos médico-farmacéuticos con la excepción de los otros materiales poliolefínicos descriptos en este capítulo.

CARACTERÍSTICAS

Polvo, perlas, gránulos o, después de su transformación, láminas de espesor variable o envases. Prácticamente insolubles en agua, etanol, hexano y metanol; solubles en hidrocarburos aromáticos calientes. Se ablandan a temperaturas entre 65 y 165 °C. Se queman con una llama azul.

IDENTIFICACIÓN

A - Absorción infrarroja <460>. A 0,25 g del material a ensayar agregar 10 ml de tolueno y calentar a reflujo durante 15 minutos. Colocar algunas gotas de la solución obtenida sobre una placa de cloruro de sodio y evaporar el solvente en una estufa a 80 °C. El espectro del material presenta máximos de absorción a 2.920; 2.850; 1.475; 1.465; 1.380; 1.170; 735 y 720 cm^{-1}, el espectro obtenido debe ser idéntico al espectro obtenido con el material seleccionado como referencia. [NOTA: si el material a ensayar se presenta en forma de láminas, el espectro puede determinarse directamente sobre un trozo de tamaño apropiado.]

B - Debe cumplir con los *Ensayos suplementarios* para los aditivos presentes.

C - En un crisol de platino, mezclar aproximadamente 20 mg del material a ensayar con 1 g de sulfato ácido de potasio y calentar hasta fundir completamente. Dejar enfriar y agregar 20 ml de ácido sulfúrico diluido. Calentar suavemente y filtrar la solución resultante. Al filtrado agregar 1 ml de ácido fosfórico y 1 ml de solución de peróxido de hidrógeno al 30 %. Si la sustancia contiene dióxido de titanio como opacante, se desarrolla un color anaranjado-amarillento.

ENSAYOS - [NOTA: si es necesario, cortar las muestras del material a ensayar en trozos de tamaño apropiado.]

Solución S_1 - Transferir 25 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 500 ml de *Agua para Inyectables* y calentar a reflujo durante 5 horas. Dejar enfriar y decantar. Reservar una porción de la solución para el ensayo de *Aspecto de la solución S_1* y filtrar el resto a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media. Emplear la *Solución S_1* dentro de las 4 horas de su preparación.

Solución S_2 - Transferir 2,0 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 80 ml de tolueno y calentar a reflujo con agitación constante durante 90 minutos. Enfriar a 60 °C y agregar, con agitación constante, 120 ml de metanol. Filtrar la solución a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media. Lavar el erlenmeyer y el filtro con 25 ml de una mezcla de 40 ml de tolueno y 60 ml de metanol, agregar el lavado al filtrado y diluir a 250 ml con la misma mezcla. Preparar un blanco.

Solución S_3 - Transferir 100 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 250 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y calentar a reflujo con agitación constante durante 1 hora. Dejar enfriar y decantar la solución.

Solución indicadora - Disolver en alcohol 0,1 g de azul de bromotimol, 20 mg de rojo de metilo y 0,2 g de fenolftaleína. Diluir a 100 ml con el mismo solvente y filtrar.

Aspecto de la solución S_1 - La *Solución S_1* debe ser transparente e incolora.

Acidez o alcalinidad - A 100 ml de la *Solución S_1* agregar 0,15 ml de *Solución indicadora*. No se deben requerir más de 1,5 ml de hidróxido de sodio 0,01 N para cambiar el color del indicador a azul. A 100 ml de *Solución S_1* agregar 0,2 ml de naranja de metilo (SR). No se debe requerir más de 1 ml de ácido clorhídrico 0,01 N para iniciar el cambio de color del indicador de amarillo a anaranjado.

Absorbancia - Entre 220 y 340 nm, la absorbancia de la *Solución S_1* no debe ser mayor de 0,2.

Sustancias reductoras - A 20 ml de la *Solución S_1* agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20 ml de permanganato de potasio 0,002 M. Calentar a reflujo durante 3 minutos y enfriar inmediatamente. Agregar 1 g de ioduro de potasio y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR) como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre los volúmenes no debe ser mayor de 3,0 ml.

Metales pesados extraíbles –

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Disolver 25,0 g de acetato de amonio en 25,0 ml de agua y agregar 38,0 ml de ácido clorhídrico al 25 %. Ajustar a pH 3,5 si fuera necesario, con ácido clorhídrico 2 M o con amoníaco diluido y diluir a 100 ml con agua.

Solución muestra - Concentrar 50 ml de *Solución S_3* hasta aproximadamente 5 ml en baño de agua y diluir a 20 ml con agua. A 12 ml de la solución así obtenida agregar 2 ml de *Solución reguladora de acetato pH 3,5* y mezclar. A continuación agregar 1,2 ml de tioacetamida-glicerina básica (SR) y mezclar inmediatamente.

Solución estándar - Proceder según se indica para la *Solución muestra* empleando una mezcla de 2,5 ml de *Solución estándar de plomo* (ver *590. Límite de metales pesados*) y 2 ml de la *Solución muestra*.

Solución blanco - Proceder según se indica para la *Solución muestra* empleando una mezcla de 10 ml de agua y 2 ml de la *Solución muestra*.

Después de 2 minutos, la coloración parda de la *Solución muestra* no debe ser más intensa que la de la *Solución estándar*. No deben encontrarse más de 2,5 ppm.

Residuo de ignición <270> - No más de 1,0 %, determinado sobre 5,0 g. Este límite no se aplica a los materiales que contienen dióxido de titanio como opacante.

ENSAYOS SUPLEMENTARIOS - [NOTA: estos ensayos se realizan totalmente o en parte sólo si son requeridos de acuerdo a la composición o el uso del material.]

Antioxidantes fenólicos –

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos con un detector ultravioleta ajustado a 280 nm y una columna de 25 cm × 4,6mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5 µm de diámetro.

Fase móvil - Se puede emplear una de las cuatro mezclas siguientes:

Fase móvil 1 - Acetonitrilo y agua (70:30) con un caudal de aproximadamente 2 ml por minuto.

Fase móvil 2 - Acetonitrilo, tetrahidrofurano y agua (60:30:10) con un caudal de aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil 3 - Metanol, 2-propanol y agua (50:45:5) con un caudal de aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil 4 - Acetonitrilo y tetrahidrofurano (80:20) con un caudal de aproximadamente 1,5 ml por minuto.

[NOTA: de las siguientes *Soluciones estándar*, preparar únicamente las necesarias para el ensayo de los antioxidantes fenólicos declarados en la composición del material a ensayar.]

Solución estándar A - Disolver 25 mg de butilhidroxitolueno y 60 mg de 3,3-bis(3-t*er*-butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno en 10 ml de una mezcla acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar B - Disolver 60 mg de tetrakis [3-(3,5-di-t*er*-butil-4-hidroxifenil)-propionato] de pentaeritritilo y 60 mg de 2,2',2",6,6',6"-hexa-*ter*-butil-4,4',4"-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)trismetileno]trifenol en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar C - Disolver 60 mg de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo y 60 mg de fosfito tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo) en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar D - Disolver 25 mg de butilhidroxitolueno en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar E - Disolver 60 mg de 3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar F - Disolver 60 mg de 1,3,5-tris[3,5di-*ter*-butil-4-hidroxibencil]-s-triazina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar G - Disolver 60 mg de tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)pro-pionato] de pentaeritritilo en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar H - Disolver 60 mg de 2,2',2",6,6',6"-hexa-*ter*-butil-4,4',4"-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)trismetileno]trifenol en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar I - Disolver 60 mg de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar J - Disolver 60 mg de fosfito de tris (2,4-di-*ter*-butilfenilo) en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar K - Disolver 20 mg de P-EPQ en 10 ml de una mezcla de volúmenes iguales de acetonitrilo y una solución de hidroperóxido de terbutilo en tetrahidrofurano con una concentración de 10 g/1. Dejar reposar en un recipiente cerrado durante 1 hora. Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50).

Solución muestra S_{21} - Evaporar 50 ml de la *Solución S_2* a sequedad al vacío a 45 °C. Disolver el residuo en 5 ml de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Preparar una solución blanco a partir del blanco correspondiente a la *Solución S_2*.

Solución muestra S_{22} - Evaporar 50 ml de la *Solución S_2* a sequedad al vacío a 45 °C. Disolver el residuo con 5 ml de cloruro de metileno. Preparar una solución blanco a partir de la solución blanco que corresponde a la *Solución S_2*.

Solución muestra S_{23} - Evaporar 50 ml de la *Solución S_2* a sequedad al vacío a 45 °C. Disolver el residuo con 5 ml de una mezcla de volúmenes iguales de acetonitrilo y una solución de hidroperóxido de terbutilo en tetrahidrofurano con una concentración de 10 g/1. Cerrar el matraz y dejar reposar durante 1 hora. Preparar una solución blanco a

partir de la solución blanco que corresponde a la *Solución S_2*.

Aptitud del sistema - (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar A*, empleando *Fase móvil 1*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre los picos de butilhidroxitolueno y 3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno no debe ser menor de 8. Cromatografiar la *Solución estándar B*, empleando *Fase móvil 2*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de tetrakis [3-(3,5-*ter*-butil-4-hidroxi-fenil)propionato] de pentaeritritilo y 2,2',2",6,6',6"-hexa-*ter*-butil-4,4',4"-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)tris-metileno]trifenol no debe ser menor de 2. Cromatografiar la *Solución estándar C*, empleando *Fase móvil 3*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo y fosfito de tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo) no debe ser menor de 2. Cromatografiar la *Solución estándar E*, empleando *Fase móvil 4*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución *R* entre los picos principales (con tiempos de retención de aproximadamente 3,5 y 5,8) no debe ser menor de 6.

Procedimiento –

Emplear *Fase móvil 1* si el material a ensayar contiene butilhidroxitolueno y/o 3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)-butirato de etileno. Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra S_{21}*, el blanco correspondiente, la *Solución estándar A*, y las *Soluciones estándar D* o *E* o 20 µl de las *Soluciones estándar D* y *E*.

Emplear *Fase móvil 2* si el material a ensayar contiene uno o varios de los siguientes antioxidantes:

- 1,3,5-tris(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxibencil)-*s*-triazina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona,
- tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxi-fenil)propionato] de pentaeritritilo,
- 2,2',2",6,6',6"-hexa-*ter*-butil-4,4',4"-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil) trismetileno] trilfenol,
- 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo,
- fosfito de tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo),

Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra S_{21}*, el blanco correspondiente, la *Solución estándar B* y cada una de las *Soluciones estándar* de antioxidantes de la lista anterior que son declarados en la composición.

Emplear *Fase móvil 3* si el material a ensayar contiene 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil) propionato de octadecilo y/o fosfito de tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo). Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra S_{22}*, el blanco correspondiente, la *Solución estándar C*, y la *Solución estándar I* o *J* o 20 µl de las *Soluciones estándar I* y *J*.

Emplear *Fase móvil 4* si la sustancia a ensayar contiene P-EPQ. Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra S_{23}*, el blanco correspondiente y la *Solución, estándar K*.

En todos los casos registrar los cromatogramas durante 30 minutos. Los cromatogramas correspondientes a las *Soluciones muestra S_{21}*, *S_{22}* y *S_{23}* deben presentar únicamente picos debidos a los antioxidantes declarados en la composición y otros picos menores que también aparecen en los cromatogramas correspondientes a los blancos. Las respuestas de los picos de las *Soluciones muestra S_{21}*, *S_{22}* y *S_{23}* deben ser menores que las respuestas correspondientes a los picos obtenidos a partir de las *Soluciones estándar D* a *K*.

Antioxidantes no-fenólicos –

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil 1 - Hexano.

Fase móvil 2 - Cloruro de metileno.

Solución estándar L - Disolver 60 mg de 2,2'-bis(octadeciloxi)-5,5'-espirobi [1,3,2-dioxafosforinano] en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 10 ml con cloruro de metileno acidificado (SR).

Solución estándar M - Disolver 60 mg de disulfuro de dioctadecilo en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 10 ml con cloruro de metileno acidificado (SR).

Solución estándar N - Disolver 60 mg de 3,3'-tiodipropionato de didodecilo en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 10 ml con cloruro de metileno acidificado (SR).

Solución estándar O - Disolver 60 mg de 3,3'-tiodipropionato de dioctadecilo en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 10 ml con cloruro de metileno acidificado (SR).

Solución estándar P - Disolver 60 mg de 3,3'-tiodipropionato de didodecilo y 60 mg de 3,3'-tiodipropionato de dioctadeciIo en 10 ml de cloruro

de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 10 ml con cloruro de metileno acidificado (SR).

Solución muestra S_{24} - Evaporar 100 ml de la *Solución S_2* a sequedad en vacío a 45 °C. Disolver el residuo en 2 ml de cloruro de metileno acidificado (SR).

Revelador - Preparar una solución de iodo al 1 % en etanol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 20 µl de la *Solución muestra S_{24}*, 20 µl de la *Solución estándar P* y 20 µl de cada una de las *Soluciones estándar* que corresponden a todos los antioxidantes fenólicos y no-fenólicos presentes en la composición del material a ensayar. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 18 cm empleando *Fase móvil 1*. Retirar la placa de la cámara y dejar secar. Desarrollar nuevamente los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 17 cm empleando *Fase móvil 2*. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar. Examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*, dejar secar durante 10 a 15 minutos y examinar bajo luz ultravioleta a 254 nm. Cualquier mancha en el cromatograma de la *Solución muestra S_{24}* no debe ser más intensa que las manchas correspondientes obtenidas a partir de las *Soluciones estándar*. El ensayo no es válido a menos que el cromatograma de la *Solución estándar P* presente dos manchas claramente separadas.

Amidas y estearatos –

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil 1 - 2,2,4-Trimetilpentano y etanol (75:25).

Fase móvil 2 - Hexano.

Fase móvil 3 - Cloruro de metileno y metanol (95:5).

Solución estándar Q - Disolver 20 mg de ácido esteárico en 10 ml de cloruro de metileno.

Solución estándar R - Disolver 40 mg de oleamida en 20 ml de cloruro de metileno.

Solución estándar S - Disolver 40 mg de erucamida en 20 ml de cloruro de metileno.

Solución muestra - *Solución S_{24}* preparada en *Antioxidantes no fenólicos*.

Revelador 1 - Solución de 2,6-Dicloro-fenolindofenol sódico al 0,2 % en etanol.

Revelador 2 - Solución de ácido fosfomolíbdico al 4 % en etanol.

Procedimiento - Aplicar sobre dos placas 10 µl de la *Solución S_{24}*. Aplicar sobre la primera placa 10 µl de la *Solución estándar Q* y aplicar sobre la segunda placa 10 µl de las *Soluciones estándar R* y *S*. Dejar secar las aplicaciones. Desarrollar la primera placa, hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 1*. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejarla secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1*. Calentar en una estufa a 120 °C durante unos minutos para intensificar las manchas. Cualquier mancha que corresponda a ácido esteárico en el cromatograma de la *Solución muestra S_{24}* debe ser idéntica en posición (R_f aproximadamente de 0,5) pero no más intensa que la mancha obtenida a partir de la *Solución estándar Q*.

Desarrollar la segunda placa hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 13 cm empleando *Fase móvil 2*. Retirar la placa de la cámara y dejar secar al aire. Desarrollar nuevamente hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 3*. Retirar la placa de la cámara y marcar el frente del solvente. Dejar secar la placa. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 2*. Calentar en una estufa a 120 °C hasta que aparezcan las manchas. Las manchas que corresponden a erucamida u oleamida en el cromatograma de la *Solución muestra S_{24}* deben ser idénticas en posición (R_f aproximadamente de 0,2) pero no más intensas que las manchas obtenidas a partir de las *Soluciones estándar R* y *S*.

Sustancias solubles en hexano - Transferir 10 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de 250 ml con boca esmerilada. Agregar 100 ml de hexano y calentar a reflujo durante 4 horas, agitando constantemente. Enfriar en un baño de hielo y filtrar rápidamente (el tiempo de filtración debe ser menor de 5 minutos, si es necesario la filtración puede ser acelerada aplicando presión sobre la solución) a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media manteniendo la solución a aproximadamente 0 °C. Evaporar 20 ml del filtrado en un cristalizador previamente pesado en un baño de agua. Secar el residuo en una estufa entre 100 y 105 °C durante 1 hora. El peso del residuo obtenido debe ser igual al del residuo obtenido a partir del material de referencia, con una desviación máxima de ± 10 % y dicho peso no debe ser mayor de 5 %.

Aluminio extraíble - (ver *440. Espectrofotometría de absorción, y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Disolver en agua una cantidad de sulfato de potasio y aluminio, equivalente a 352 mg de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$. Agregar

10 ml de ácido sulfúrico diluido y diluir a 100 ml con agua (200 ppm de A1).

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con ácido clorhídrico 0,1 M.

Solución muestra - Evaporar a sequedad 100 ml de *Solución S_3* en un baño de agua. Disolver el residuo en 2 ml de ácido clorhídrico y diluir a 10 ml con ácido clorhídrico 0,1 M.

Procedimiento - Medir la absorbancia a 309,3 nm empleando una lámpara de aluminio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de óxido nitroso-acetileno. No debe contener más de 1 ppm de Al extraíble.

Titanio extraíble - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución muestra – Evaporar a sequedad 100 ml de *Solución S_3* en un baño de agua. Disolver el residuo en 2 ml de ácido clorhídrico y diluir a 10,0 ml con ácido clorhídrico 0,1 M.

Solución madre del estándar - Disolver 100,0 mg de titanio en 100 ml de ácido clorhídrico diluido hasta 150 ml con agua, calentando si fuera necesario. Dejar enfriar y diluir a 1 litro con agua (100 ppm de Ti).

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con ácido clorhídrico 0,1 M.

Procedimiento - Medir la absorbancia a 364,3 nm empleando una lámpara de titanio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de óxido nitroso-acetileno. No debe contener más de 1 ppm de Ti extraíble.

Cinc extraíble - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad de sulfato de cinc, equivalente a 440 mg de $ZnSO_4 . 7H_2O$, en agua. Agregar 1 ml de ácido acético y diluir a 100 ml con agua. Diluir 1 ml de esta solución a 10 ml con agua. Antes de usar, diluir 1 ml de esta solución a 10 ml con agua (10 ppm de Zn).

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando una *Solución madre del estándar* diluida con ácido clorhídrico 0,1 M.

Solución muestra - *Solución S_3.*

Procedimiento - Medir la absorbancia a 213,9 nm empleando una lámpara de cinc de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de acetileno-aire. No debe contener más de 1 ppm de Zn extraíble.

LÍMITES DE ADITIVOS

ADITIVOS	LÍMITES (%)
Aditivos antioxidantes –	
butilhidroxitolueno	0,125
tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4 hidoxifenil)propionato] de pentaeritritilo	0,3
1,3,5-tris(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxibencil)-s-triazina-2,4,6-(*1H,3H,5H*)triona	0,3
3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo	0,3
3,3-bis(3-*ter*- butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno	0,3
disulfuro de dioctadecilo	0,3
2,2′,2″,6,6′,6″-hexa-*ter*-butil-4,4′,4″-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)trismetileno]trifenol	0,3
2,2'-bis(octadeciloxi)-5,5'-espirobi(1,3,2-dioxafosforinano)	0,3
3,3´-tiodopropionato de didodecilo	0,3
3,3´- tiodipropionato de dioctadecilo	0,3
fosfito de tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo)	0,3
P-EPQ	0,1
copolímero de succinato de dimetilo y (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-il)etanol	0,3
El total de de aditivos antioxidante enumerados anteriormente	**0,3**
Otros aditivos-	
hidrocalcita	0,5
alcanoamidas	0,5

LÍMITES DE ADITIVOS – **continuación**

ADITIVOS	LÍMITES (%)
alquenoamidas	0,5
silicio-aluminato de sodio	0,5
sílice	0,5
benzoato de sodio	0,5
ésteres o sales de ácidos grasos	0,5
fosfato trisódico	0,5
vaselina líquida	0,5
óxido de cinc	0,5
talco	0,5
estearato de calcio o cinc o una mezcla de ambos	0,5
dióxido de titanio	4
óxido de magnesio	0,2

Polietileno de baja densidad para envases destinados a preparaciones para uso parenteral y para preparaciones oftálmicas

El polietileno de baja densidad que cumple con los siguientes requisitos se emplea en la fabricación de envases para preparaciones de uso parenteral y oftálmico.

El polietileno de baja densidad se obtiene por polimerización de etileno a altas presiones en presencia de oxígeno o catalizadores. El material no debe poseer aditivos.

CARACTERISTICAS

Perlas, gránulos, láminas translúcidas de espesor variable, prácticamente insoluble en agua, etanol y metanol. Se ablanda por encima de los 80 °C. Se quema con una llama azul.

IDENTIFICACION

A - Absorción infrarroja <460>. A 250 mg del material a ensayar, agregar 10 ml de tolueno y calentar a reflujo durante 15 minutos. Colocar unas gotas de la solución sobre un disco de cloruro de sodio y evaporar el solvente a 80 °C. El espectro del material a ensayar debe presentar máximos en particular a 2.920; 2.850; 1.465; 731 y; 722 cm^{-1}; y el espectro debe ser idéntico al obtenido con el material seleccionado como referencia. [NOTA: si el material a ensayar se presenta en forma de láminas, el espectro puede determinarse directamente sobre un trozo de tamaño apropiado.]

B - A 2 g de material a ensayar agregar 100 ml de agua y calentar a reflujo durante 2 horas. Dejar enfriar. La densidad relativa del material (ver *160. Determinación de la densidad relativa*) debe estar entre 0,910 y 0,935.

ENSAYOS - [NOTA: si es necesario, cortar el material en trozos de tamaño apropiado.]

Solución indicadora - Disolver en alcohol 100 mg de azul de bromotimol, 20 mg de rojo de metilo y 0,2 g de fenolftaleína. Diluir a 100 ml con el mismo solvente y filtrar.

Solución S - Transferir 25 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 500 ml de agua y calentar a reflujo durante 5 horas. Dejar enfriar y decantar.

Aspecto de la solución - La *Solución S* debe ser transparente, incolora y prácticamente inodora.

Acidez o alcalinidad - A 100 ml de *Solución S* agregar 0,15 ml de *Solución indicadora*. No se deben requerir más de 1,5 ml de hidróxido de sodio 0,01 N para cambiar el color del indicador a azul. A 100 ml de la *Solución S* agregar 0,2 ml de naranja de metilo (SR). No se debe requerir más de 1,0 ml de ácido clorhídrico 0,01 N para iniciar el cambio de color del indicador de amarillo a anaranjado.

Sustancias solubles en hexano - Transferir 5 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 50 ml de hexano, adaptar un refrigerante y calentar en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas. Enfriar en un baño de hielo, se puede formar un gel. Adaptar una camisa de enfriamiento, llena de agua helada, a un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media adaptado con un dispositivo que permite aplicar presión durante la filtración.

Dejar enfriar el filtro durante 15 minutos. Filtrar la solución de hexano aplicando una presión de 27 kPa sin lavar el residuo; el tiempo de filtración no debe exceder 5 minutos. Evaporar 20 ml de la solución hasta sequedad. Secar el residuo a 100 °C durante 1 hora. El residuo no debe pesar más de 60 mg (3 %).

Sustancias reductoras - A 20 ml de *Solución S* agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20 ml de permanganato de potasio 0,002 M. Calentar a reflujo durante 3 minutos y enfriar inmediatamente. Agregar 1 g de ioduro de potasio y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR) como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre los volúmenes no debe ser mayor de 0,5 ml.

Aditivos –

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil 1 - Hexano.

Fase móvil 2 - Cloruro de metileno y metanol (95:5).

Solución muestra - Transferir 2,0 g del material a ensayar y 5 ml de cloroformo a un recipiente de 10 ml de paredes gruesas de vidrio tipo I ó II (ver *430. Envases de vidrio*). Cerrar el mismo con un tapón de goma recubierto con politetrafluoretileno. Colocar el recipiente en un baño de agua a 85 °C durante 2 horas. Retirarlo, invertirlo y dejarlo enfriar. Decantar la solución clorofórmica transparente.

Solución estándar - Disolver 20 mg de disulfuro de dioctadecilo y 20 mg de bis[3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)butirato] de etileno en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Revelador - Solución de ácido fosfomolíbdico al 4 % en alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 10 µl de cada solución. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 13 cm empleando *Fase móvil 1*. Retirar la placa de la cámara y dejarla secar al aire. Desarrollar nuevamente los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 2*. Retirar la placa de la cámara y dejarla secar al aire. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar a 120 °C hasta que las manchas aparezcan en el cromatograma de la *Solución estándar*. No debe aparecer ninguna mancha en el cromatograma de la *Solución muestra*, a excepción de una mancha que puede estar en el frente del solvente del primer desarrollo y que corresponde a oligómeros. El cromatograma de la *Solución estándar* debe presentar dos manchas separadas.

Residuo de ignición - <270>. No debe ser mayor de 200 ppm, determinado sobre 10 g.

Polietileno de alta densidad para envases destinados a preparaciones de uso parenteral

El polietileno de alta densidad que cumple con los siguientes requisitos es apropiado para la fabricación de envases y tapones destinados a preparaciones de uso parenteral.

El polietileno de alta densidad (también llamado de "baja presión") es obtenido por polimerización de etileno a baja presión en presencia de catalizadores.

LÍMITES DE ADITIVOS Y ESTABILIZANTES

ADITIVOS	LÍMITES (%)
Estabilizantes – puede contener no mas de tres de los siguientes estabilizantes:	
butilhidroxitolueno	0,125
Tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de pentaeritritilo	0,2
3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo	0,2
3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno	0,2
2,2′,2″,6,6′,6″-hexa-*ter*-butil-4,4′,4″-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)trismetileno] trifenol	0,2
2,2′-bis(octadeciloxi)-5,5′-espirobi [1,3,2-dioxafosforinano]	0,2
3,3′-tiodipropionato de didodecilo	0,2
3,3′-tiodipropionato de dioctadecilo	0,2
Aditivos	
estearato de calcio o estearato de cinc o una mezcla de ambos	0,5

CARACTERISTICAS

Polvo, perlas, gránulos o láminas translúcidas de espesor variable. Es prácticamente insoluble en agua, etanol, hexano y metanol; soluble en caliente en hidrocarburos aromáticos. Se ablanda a temperaturas mayores de 120 °C. Se quema con una llama azul.

IDENTIFICACION

A - Absorción infrarroja <460>. A 250 mg del material a ensayar agregar 10 ml de tolueno y ca-

lentar a reflujo durante aproximadamente 15 minutos. Colocar unas gotas de la solución sobre una placa de cloruro de sodio y evaporar el solvente a 80 °C. Los máximos de absorción en el espectro obtenido con el material ensayado deben corresponder en posición e intensidad relativa a los del espectro obtenido con el polietileno de alta densidad SR-FA. [NOTA: si el material a ensayar se presenta en forma de láminas, el espectro puede determinarse directamente sobre un trozo de tamaño apropiado.]

B - A 2 g del material a ensayar agregar 100 ml de agua, calentar a reflujo durante 2 horas y dejar enfriar. La densidad relativa del material (ver *160. Determinación de la densidad relativa*) debe estar entre 0,935 y 0,965.

ENSAYOS

[NOTA: si es necesario, cortar el material en trozos de tamaño apropiado.]

Solución indicadora - Disolver en alcohol 100 mg de azul de bromotimol, 20 mg de rojo de metilo y 200 mg de fenolftaleína. Diluir a 100 ml con el mismo solvente y filtrar.

Solución S_1 - Transferir 2,0 g de material a ensayar y 5 ml de cloroformo acidificado (SR) a un recipiente de 10 ml de paredes gruesas de vidrio tipo I ó II (ver *430. Envases de vidrio*). Cerrar el recipiente con un tapón de goma cubierto con politetrafluoroetileno. Colocar el mismo en un baño de agua a 85 °C durante 2 horas. Invertirlo y enfriarlo. Decantar la solución clorofórmica transparente.

Solución S_2 - Transferir 25 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 500 ml de agua y calentar a reflujo durante 5 horas. Dejar enfriar y decantar la solución. Reservar una porción de la solución para el ensayo *Aspecto de la solución S_2* y filtrar el resto a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media. Emplear dentro de las 4 horas de preparación.

Solución S_3 - Transferir 100 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 200 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y calentar a reflujo con agitación constante durante 1 hora. Enfriar, filtrar y evaporar el filtrado a sequedad. Disolver el residuo en 2 ml de ácido clorhídrico y diluir a 10,0 ml con ácido clorhídrico 0,1 M.

Aspecto de la solución S_2 - Debe ser transparente e incolora.

Acidez o alcalinidad – A 100 ml de *Solución S_2* agregar 0,15 ml de *Solución indicadora*. No se deben requerir más de 1,5 ml de hidróxido de sodio 0,01 N para cambiar el color del indicador a azul. A 100 ml de *Solución S_2*, agregar 0,2 ml de naranja de metilo (SR). No se deben requerir más de 1 ml de ácido clorhídrico 0,01 N para iniciar el cambio de color del indicador de amarillo a anaranjado.

Absorbancia - A longitudes de onda entre 220 y 340 nm, la absorbancia de la *Solución S_2*, no debe ser mayor de 0,2.

Sustancias reductoras - A 20 ml de *Solución S_2* agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20 ml de permanganato de potasio 0,002 M. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Agregar 1 g de ioduro de potasio y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR) como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre los volúmenes no debe ser mayor de 0,5 ml.

Aditivos –

Fase estacionaria - Emplear tres placas para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil 1 - Hexano.

Fase móvil 2 - Cloruro de metileno y hexano (80:20).

Fase móvil 3 - Cloruro de metileno y metanol (95:5).

Solución estándar A - Disolver 5 mg de butilhidroxitolueno en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar B - Disolver 8 mg de tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxi-fenil)propionato] de pentaeritritilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar C - Disolver 8 mg de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar D - Disolver 8 mg de 3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar E - Disolver 8 mg de 2,2',2'',6,6',6''-hexa-*ter*-butil-4,4',4''-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)trismetilen]trifenol en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar F - Disolver 8 mg de 2,2′-bis(octadeciloxi)-5,5′-espirobi [1,3,2-dioxafosforinano] en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar G - Disolver 8 mg de 3,3′-tiodipropionato de didodecilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar H - Disolver 8 mg de 3,3'-tiodipropionato de dioctadecilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar I - Disolver 20 mg de ácido esteárico en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución muestra - *Solución S_1*

Revelador 1 - Solución de cloruro férrico al 5 % recientemente preparada.

Revelador 2 - Solución de ferricianuro de potasio al 5 %.

Revelador 3 - Acido sulfúrico.

Revelador 4 - Solución de ácido fósfomolíbdico al 4 % en alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre cada placa 10 µl de cada solución. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 13 cm empleando *Fase móvil 1*. Retirar las placas de la cámara y dejar secar al aire.

Para la segunda placa, desarrollar nuevamente los cromatogramas en la misma dirección hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 2*. Retirar la placa de la cámara y dejar secar al aire.

Para la tercera placa, desarrollar nuevamente los cromatogramas en la misma dirección hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 3*. Retirar la placa de la cámara y dejar secar al aire.

Examinar la primera placa bajo luz ultravioleta a 254 nm. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar una mancha que corresponde a la mancha en el cromatograma de la *Solución estándar A.* Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1* y luego con *Revelador 2*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar una mancha que corresponde a la mancha en el cromatograma de la *Solución estándar A*.

Pulverizar sobre la segunda placa con *Revelado 1* y luego con *Revelador 2*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar las manchas que corresponden a las manchas en los cromatogramas de las *Soluciones estándar A*, *B* y *D*. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 3* y calentar a 120 °C hasta que las manchas aparezcan en los cromatogramas de las *Soluciones estándar F*, *G* y *H*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar las manchas que corresponden a esas soluciones en los cromatogramas de las *Soluciones estándar*.

Pulverizar sobre la tercera placa con *Revelador 4* y calentar a 120 °C hasta que aparezcan las manchas en los cromatogramas de las *Soluciones estándar*. Las manchas aparecen rápidamente en los cromatogramas de las *Soluciones estándar A, B, C, D, E, F, G* y *H*. La mancha en el cromatograma de la *Solución estándar 1* debe aparecer más lentamente. El cromatograma de la *Solución muestra* no debe presentar más de tres manchas y éstas corresponden a las manchas en los cromatogramas de las *Soluciones estándar A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* o *H*; debe presentar también una mancha que corresponde a la mancha en el cromatograma de la *Solución estándar 1*. Las manchas en el cromatograma de la *Solución muestra* no deben ser más intensas que las manchas correspondientes en los cromatogramas de las *Soluciones estándar*.

[NOTA: en el cromatograma de la *Solución muestra* cualquier mancha cercana al frente del solvente desde el primer desarrollo no debe tenerse en cuenta (polímeros de bajo peso molecular-relativo).].

Circonio - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad de nitrato de circonilo, equivalente a 293 mg de $[ZrO(NO_3)_2 . 2H_2O]$, en una mezcla de agua y ácido clorhídrico (8:2). Diluir a 100 ml con la misma mezcla de solventes para obtener una solución con una concentración conocida de 0,1 % de Zr.

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con una mezcla de agua y ácido clorhídrico (8:2).

Solución muestra - *Solución S_3*

Procedimiento - Medir la absorbancia a 360,1 nm empleando una lámpara de circonio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de óxido nitroso-acetileno. No debe estar presente más de 100 ppm de Zr.

Cromo - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad de dicromato de potasio, equivalente a 283 mg de $K_2Cr_2O_7$, en agua y diluir a 1 litro con el mismo solvente para obtener una solución que contenga 100 ppm de Cr.

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con una mezcla de agua y ácido clorhídrico (8:2).

Solución muestra - *Solución S_3*

Procedimiento - Medir la absorbancia a 358,0 nm empleando una lámpara de cromo de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de aire-acetileno. No debe estar presente más de 0,05 ppm de Cr.

Vanadio - (ver 440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica).

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad de vanadato de amonio, equivalente a 230 mg de NH_4VO_3, en agua y diluir a 100,0 ml con el mismo solvente (0,1 % de V).

Solución estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con una mezcla de agua y ácido clorhídrico (8:2).

Solución muestra - *Solución S_3*

Procedimiento - Medir la absorbancia a 318,3 nm empleando una lámpara de vanadio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de acetileno-óxido nitroso. No debe estar presente más de 10 ppm de V.

Residuo de ignición <270> - No más de 0,2 %, determinado sobre 5 g.

Polipropileno para envases y tapones destinados a preparaciones de uso parenteral

El polipropileno consiste en un homopolímero de propileno o de un copolímero de propileno con hasta 20 % de etileno o de una mezcla de polipropileno con hasta un 20 % de polietileno.

LIMITES DE ADITIVOS Y ESTABILIZANTES

ADITIVOS	LÍMITES (%)
Estabilizantes – puede contener no más de tres de los siguientes estabilizantes:	
Tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de pentaeritritilo	0,3
3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo	0,3
3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno	0,3
2,2′,2″,6,6′,6″-hexa-*ter*-butil-4,4′,4″-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)trismetilen] trifenol	0,3
2,2′-bis(octadeciloxi)-5,5′-espirobi [1,3,2-dioxafosforinano]	0,3
3,3′-tiodipropionato de didodecilo	0,3
3,3′-tiodipropionato de dioctadecilo	0,3
disulfuro de dioctadecilo	0,3
butilhidroxitolueno	0,125
Aditivos	
estearato de calcio o estearato de cinc o una mezcla de ambos	0,2

CARACTERÍSTICAS

Polvo, perlas, gránulos o láminas translúcidas de espesor variable. El polipropileno es prácticamente insoluble en agua, etanol y metanol; es también prácticamente insoluble en hexano el cual disuelve polímeros residuales de bajo peso molecular; ligeramente soluble en decalina, tetralina, tolueno y xileno a ebullición. Se ablanda a temperaturas por encima de 150 °C. Se quema con una llama azul.

IDENTIFICACIÓN

Absorción infrarroja <460>. A 250 mg del material a ensayar agregar 10 ml de tolueno y calentar a reflujo durante aproximadamente 15 minutos. Colocar unas gotas de la solución caliente sobre una placa de cloruro de sodio y evaporar el solvente a 80 °C. Los máximos de absorción en el espectro obtenido corresponden en posición e intensidad relativa a los del espectro obtenido con polipropileno SR-FA. Los espectros de copolímeros y mezclas deben presentar un máximo adicional aproximadamente a 720 cm^{-1}. [NOTA: si el material a ensayar se presenta en forma de láminas, el espectro puede determinarse directamente sobre un trozo de tamaño apropiado].

ENSAYOS - [NOTA: si es necesario, cortar el material en trozos de tamaño apropiado].

Solución indicadora - Disolver en alcohol 100 mg de azul de bromotimol, 20 mg de rojo de metilo y 200 mg de fenolftaleína. Diluir a 100 ml con el mismo solvente y filtrar.

Solución S_1 - Transferir 2,0 g del material a ensayar y 5 ml de cloroformo acidificado (SR) a un recipiente de 10 ml de paredes gruesas de vidrio tipo I ó II (ver *430. Envases de vidrio*). Cerrar el recipiente con un tapón elastomérico con una cubierta de politetrafluoroetileno y asegurar el tapón. Colocar el recipiente en un baño de agua a 85 °C durante 2 horas. Retirarlo, invertirlo y dejarlo enfriar. Decantar la solución clorofórmica transparente.

Solución S_2 - Transferir 25 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 500 ml de agua y calentar a reflujo durante 5 horas. Dejar enfriar y decantar la solución. Reservar una porción de la solución para el ensayo *Aspecto de la solución S_2* y filtrar el resto a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media.

Solución S_3 - Transferir 100 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca

esmerilada. Agregar 200 ml de ácido clorhídrico 0,1 M y calentar a reflujo con agitación constante durante 1 hora. Enfriar, filtrar y evaporar el filtrado a sequedad. Disolver el residuo en 2 ml de ácido clorhídrico y diluir a 10,0 ml con ácido clorhídrico 0,1 M.

Acidez o alcalinidad - A 100 ml de *Solución S_2*, agregar 0,15 ml de *Solución indicadora*. No se deben requerir más de 1,5 ml de hidróxido de sodio 0,01 N para cambiar el color del indicador a azul. A 100 ml de *Solución S_2* agregar 0,2 ml de naranja de metilo (SR). No se debe requerir más de 1,0 ml de ácido clorhídrico 0,01 N para iniciar el cambio de color del indicador de amarillo a anaranjado.

Absorbancia - A longitudes de onda entre 220 y 340 nm, la absorbancia de la *Solución S_2* no debe ser mayor de 0,5.

Sustancias reductoras – A 20 ml de la *Solución S_2* agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20 ml de permanganato de potasio 0,002 M. Calentar a reflujo durante 3 minutos y enfriar inmediatamente. Agregar 1 g de ioduro de potasio y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR) como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre los volúmenes no debe ser mayor de 0,5 ml.

Sustancias solubles en hexano - Transferir 10 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 50 ml de hexano, adaptar un refrigerante y calentar en un baño de agua a 75 °C con agitación constante durante 4 horas. Enfriar en agua helada y filtrar rápidamente a través de un filtro de vidrio sinterizado. Evaporar 10 ml del filtrado a sequedad en un recipiente, previamente pesado y secar el residuo entre 100 y 105 °C durante 1 hora. El residuo no debe pesar más de 0,1 g (5 %).

Aditivos –

Fase estacionaria - Emplear tres placas para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromalografía*) recubiertas con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil 1 - Hexano.

Fase móvil 2 - Cloruro de metileno y éter de petróleo (80:20).

Fase móvil 3 - Cloruro de metileno y metanol (95:5).

Solución estándar A - Disolver 5 mg de butilhidroxitolueno en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar B - Disolver 12 mg de tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato] de pentaeritritilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución _estándar C - Disolver 12 mg de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar D - Disolver 12 mg de 3,3-bis(3-*ter*-butil-4-hidroxifenil)butirato de etileno en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar E - Disolver 12 mg de 2,2′,2",6,6′,6"-hexa-*ter*-butil-4,4′,4"-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil) trismetilen] trifenol en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar F - Disolver 12 mg de 2,2′-bis(octadeciloxi)-5,5′-espirobi [1,3,2-dioxafosforinano] en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar G - Disolver 12 mg de 3,3′-tiodipropionato de didodecilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar H - Disolver 12 mg de 3,3′-tiodipropionato de dioctadecilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar I - Disolver 8 mg de ácido esteárico en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución estándar J - Disolver 12 mg de disulfuro de dioctadecilo en cloroformo y diluir a 10 ml con el mismo solvente.

Solución muestra - *Solución S_1*

Revelador 1 - Solución de cloruro férrico al 5 % recientemente preparada.

Revelador 2 - Solución de ferricianuro de potasio al 5 %.

Revelador 3 - Acido sulfúrico.

Revelador 4 - Solución de ácido fosfomolíbdico al 4 % en alcohol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre cada placa 10 µl de cada solución. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 13 cm empleando *Fase móvil 1*. Retirar las placas de la cámara y dejarlas secar al aire.

Para la segunda placa, desarrollar nuevamente los cromatogramas en la misma dirección hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 2*.

Para la tercera placa, desarrollar nuevamente los cromatogramas en la misma dirección hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 3*.

Retirar las placas de las cámaras y dejarlas secar al aire. Examinar la primera placa bajo luz ultravioleta a 254 nm. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar una mancha que corresponde a la mancha en el cromatograma de la *Solución estándar A* y *J*. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 1* y luego con *Revelador 2*. El cromatograma de la *Solución muestra*

debe presentar una mancha que corresponde a la mancha en el cromatograma de la *Solución estándar A*.

Pulverizar sobre la segunda placa con *Revelador 1* y luego con *Revelador 2*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar las manchas que corresponden a las manchas en los cromatogramas de las *Soluciones estándar A*, *B*, *D* y *J*. Pulverizar sobre la placa con *Revelador 3* y calentar la placa a 120 °C hasta que las manchas aparezcan en los cromatogramas de estas *Soluciones estándar F*, *G* y *H*. El cromatograma de la *Solución muestra* debe presentar manchas que corresponden a las presentes en los cromatogramas de estas *Soluciones estándar*.

Pulverizar sobre la tercera placa con *Revelador 4* y calentar a 120 °C hasta que las manchas aparezcan en los cromatogramas de las *Soluciones estándar*. Las manchas aparecen rápidamente en los cromatogramas de las *Soluciones estándar A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* y *H*. La mancha en el cromatograma de la *Solución estándar 1* aparece más lentamente. El cromatograma de la *Solución muestra* no debe presentar más de tres manchas y éstas corresponden a las manchas en los cromatogramas de las *Soluciones estándar A*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* o *H*; puede mostrar también una mancha que corresponde a la mancha en el cromatograma de la *Solución estándar 1*. Las manchas en el cromatograma de la *Solución muestra* no deben ser más intensas que las manchas correspondientes en los cromatogramas de las *Soluciones estándar*.

[NOTA: en el cromatograma de la *Solución muestra*, cualquier mancha cercana al frente del solvente empleado para el primer desarrollo no debe tenerse en cuenta (polímeros de bajo peso molecular relativo)].

Cromo - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad de dicromato de potasio, equivalente a 0,283 g de $K_2Cr_2O_7$, en agua y diluir a 1 litro con el mismo solvente (100 ppm de Cr).

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con una mezcla de agua y ácido clorhídrico (8:2).

Solución muestra - *Solución S_3*

Procedimiento - Medir la absorbancia a 358,0 nm empleando una lámpara de cromo de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de aire-acetileno. No debe contener más de 0,05 ppm de Cr.

Vanadio - (ver *440. Espectrofotometría de absorción y emisión atómica*).

Solución madre del estándar - Disolver una cantidad de vanadato de amonio, equivalente a 0,230 g de NH_4VO_3, en agua y diluir a 100,0 ml con el mismo solvente (0,1 % de V).

Soluciones estándar - Preparar las soluciones estándar empleando la *Solución madre del estándar* diluida con una mezcla de agua y ácido clorhídrico (8:2).

Solución muestra - *Solución S_3*

Procedimiento - Medir la absorbancia a 318,3 nm empleando una lámpara de vanadio de cátodo hueco como fuente de radiación y una llama de acetileno-óxido nitroso. No debe contener más de 10 ppm de V.

Residuo de ignición <270> - No más de 0,2 %, determinado sobre 5 g.

Copolímero de etileno-acetato de vinilo para envases y tubos destinados a preparaciones para nutrición parenteral

El copolímero de etileno-acetato de vinilo se obtiene por copolimerización de mezclas de etileno y acetato de vinilo. Contiene una cantidad definida de acetato de vinilo no superior a un 25 % en los materiales que se emplean para fabricar envases y no superior a un 30 % en los materiales que se emplean para fabricar tubos.

LÍMITE DE ADITIVOS Y ESTABILIZANTES

ADITIVOS	LÍMITES (%)
Estabilizantes – puede contener no más de tres de los siguientes estabilizantes:	
butilhidroxitolueno	0,125
tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de pentaeritritilo	0,2
3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo	0,2
fosfito de tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo)	0,2
2,2′,2″,6,6′,6″-hexa-*ter*-butil-4,4′,4″-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil)trismetilen] trifenol	0,2
Aditivos -	
oleamida o erucamida	0,2
estearato de calcio o estearato de cinc o una mezcla de ambos	0,5
carbonato de calcio o hidróxido de potasio	0,5
dióxido de silicio	0,2

CARACTERÍSTICAS

Perlas, gránulos o, luego de ser transformado, láminas translúcidas o tubos de espesor variable. Es prácticamente insoluble en agua, etanol, metanol y hexano. Sin embargo el hexano disuelve los polímeros residuales de bajo peso molecular. Soluble en hidrocarburos aromáticos calientes. Se quema con una llama azul. La temperatura a la cual el material se ablanda varía con el contenido de acetato de vinilo; siendo aproximadamente de 100 °C para materiales de bajo contenido y de aproximadamente 70 °C para materiales cuyo contenido es de 30 %.

IDENTIFICACIÓN - [NOTA: si es necesario, cortar el material en trozos de tamaño apropiado].

Absorción infrarroja <460>. A 250 mg del material a ensayar agregar 10 ml de tolueno y calentar a reflujo durante aproximadamente 15 minutos. Colocar unas gotas de la solución obtenida sobre una placa de cloruro de sodio y evaporar el solvente a 80 °C. El espectro obtenido debe presentar los siguientes máximos de absorción que corresponden al acetato de vinilo: 1.740; 1.375; 1.240; 1.020 y 610 cm^{-1} y máximos que corresponden al etileno en las posiciones siguientes: 2.920 a 2.850; 1.470; 1.460; 1.375; 730 y 720 cm^{-1}. El espectro obtenido debe ser, además, idéntico al obtenido con la sustancia de referencia. [NOTA: si el material a ensayar está en forma de láminas, el espectro puede determinarse directamente sobre un trozo de tamaño apropiado.]

ENSAYOS - [NOTA: si es necesario, cortar el material en trozos de tamaño apropiado.]

Solución indicadora - Disolver en alcohol 100 mg de azul de bromotimol, 20 mg de rojo de metilo y 200 mg de fenolftaleína. Diluir a 100 ml con el mismo solvente y filtrar.

Solución S_1 - Transferir 2,0 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 80 ml de tolueno y calentar a reflujo con agitación constante durante 90 minutos. Dejar enfriar a 60 °C y agregar 120 ml de metanol con agitación constante. Filtrar la solución a través de un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media. Lavar el erlenmeyer y el filtro con 25 ml de una mezcla de 40 ml de tolueno y 60 ml de metanol, agregar el lavado al filtrado y diluir a 250 ml con la misma mezcla de solventes.

Solución S_2 - Transferir 25 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 500 ml de *Agua para Inyectables* y calentar a reflujo durante 5 horas. Dejar enfriar y decantar la solución. Reservar una porción de la solución para el ensayo *Aspecto de la solución S_2* y filtrar el resto a través de un filtro de vidrio sinterizado. Emplear dentro de las 4 horas de su preparación.

Aspecto de la solución S_2 - Debe ser transparente e incolora.

Acidez o alcalinidad - A 100 ml de la *Solución S_2* agregar 0,15 ml de *Solución indicadora*. No se deben requerir más de 1,0 ml de hidróxido de sodio 0,01 N para cambiar el color del indicador a azul. A 100 ml de *Solución S_2* agregar 0,2 ml de naranja de metilo (SR). No se deben requerir más de 1,5 ml de ácido clorhídrico 0,01 N para iniciar el cambio de color del indicador de amarillo a anaranjado.

Absorbancia - A longitudes de onda entre 220 y 340 nm, la absorbancia de la *Solución S_2* no debe ser mayor de 0,20.

Sustancias reductoras - 20 ml de la *Solución S_2* agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20 ml de permanganato de potasio 0,002 M. Calentar a reflujo durante 3 minutos y enfriar inmediatamente. Agregar 1 g de ioduro de potasio y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR) como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre los volúmenes no debe ser mayor de 0,5 ml.

Amidas y ácido esteárico

Fase estacionaria - Emplear dos placas para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil 1 - 2,2,4-Trimetilpentano y etanol (75:25).

Fase móvil 2 - Hexano

Fase móvil 3 - Cloruro de metileno y metanol (95:5).

Solución estándar A - Disolver 20 mg de ácido esteárico en 10 ml de cloruro de metileno.

Solución estándar B - Disolver 40 mg de oleamida en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 1 ml de esta solución a 5 ml con cloruro de metileno.

Solución estándar C - Disolver 40 mg de erucamida en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 1 ml de esta solución a 5 ml con cloruro de metileno.

Solución muestra - Evaporar a sequedad, aplicando vacío y a 45 °C, 100 ml de la *Solución S_1*. Disolver el residuo en 2 ml de cloruro de metileno acidificado (SR).

Revelador - Acido fosfomolíbdico al 4 % en etanol.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre cada placa 10 µl de cada solución. Dejar secar las aplicaciones. Desarrollar la primera placa hasta que

el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 1*. Retirar la placa de la cámara y dejarla secar. Pulverizar sobre la placa con *Revelador* y calentar a 120 °C durante unos minutos para intensificar las manchas. Cualquier mancha que corresponda a ácido esteárico en el cromatograma de la *Solución muestra* no debe ser más intensa que la mancha principal en el cromatograma de la *Solución estándar A*.

Desarrollar la segunda placa hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 13 cm empleando *Fase móvil 2*. Retirar la placa de la cámara y dejarla secar. Desarrollar nuevamente hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm empleando *Fase móvil 3*. Retirar la placa de la cámara y dejarla secar. Pulverizar sobre la placa con *Revelador*. Calentar en una estufa a 120 °C hasta que las manchas aparezcan. Cualquier mancha que corresponda a erucamida u oleamida en el cromatograma de la *Solución muestra* no debe ser más intensa que las manchas correspondientes en los cromatogramas de las *Soluciones estándar B* y *C*.

Antioxidantes fenólicos

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de líquidos de un detector ultravioleta ajustado a 280 mm y una columna de 25 cm × 4,6 mm con fase estacionaria constituida por octadecilsilano químicamente unido a partículas de sílice porosa de 5 µm de diámetro. El caudal es de aproximadamente 1,5 ml por minuto.

Fase móvil - Emplear una de las dos mezclas siguientes:

Fase móvil 1 - Acetonitrilo, tetrahidrofurano y agua (60:30:10).

Fase móvil 2 - Metanol, 2-propanol y agua (50:45:5).

Solución estándar A - Disolver 25 mg de butilhidroxitolueno, 40 mg de 2,2′2",6,6’6"-hexa-*ter*-butil-4,4',4"-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil) trismetilen]trifenol, 40 mg de tetrakis [3-(3,5-di-ter-butil-4-hidroxifenil)propionato] de pentaeritritilo y 40 mg de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil) prioponato de octadecilo en 10 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50). Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución estándar B - Disolver 40 mg de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil) propionato de oetadecilo y 40 mg de fosfito de tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo) en 10 ml de cloruro de metileno. Diluir 2 ml de esta solución a 50 ml con el mismo solvente.

Solución muestra A - Evaporar a sequedad, aplicando vacío y a 45 °C, 50 ml de *Solución S_1*. Disolver el residuo en 5 ml de una mezcla de acetonitrilo y tetrahidrofurano (50:50).

Solución muestra B - Evaporar a sequedad, aplicando vacío y a 45 °C, 50 ml de *Solución S_1*. Disolver el residuo en 5 ml de cloruro de metileno.

Aptitud del sistema - (ver *100. Cromatográfia*)

Empleando Fase móvil 1 - Cromatografiar la *Solución. estándar A*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: La eficiencia de la columma calculada para el pico de butilhidroxitolueno no debe ser menor de 2.500 platos teóricos y la resolución, *R*; entre los picos de tetrakis [3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato] de pentaeritritilo y 2,2',2",6,6',6"-hexa-*ter*-butil-(4,4',4"-[(2,4,6-trimetil-1,3,5-bencenotriil) trismetilen]trifenol no debe ser menor de 2,0.

Empleando Fase móvil 2 - Cromatografiar la *Solución estándar B*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, *R*, entre los picos de 3-(3,5-di-*ter*-butil-4-hidroxifenil)propionato de octadecilo y fosfito de tris(2,4-di-*ter*-butilfenilo) no debe ser menor de 2,0.

Procedimiento - *Empleando Fase móvil 1*, inyectar por separado en el cromatógrafo 20 µl de *Solución muestra A* y 20 µl de *Solución estándar A*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. El cromatograma de la *Solución muestra A* debe presentar únicamente los picos principales que corresponden a los picos en el cromatograma de la *Solución estándar A* con un tiempo de retención mayor de 2 minutos. Las respuestas de los picos en el cromatograma de la *Solución muestra A* no deben ser mayores que las de los picos correspondientes en el cromatograma de la *Solución estándar A*, a excepción del último pico eluido en el cromatograma de la *Solución estándar A*.

Si el cromatograma de la *Solución muestra A* presenta un pico con el mismo tiempo de retención que el último antioxidante eluido con la *Solución estándar A*, emplear *Fase móvil 2* y proceder según se indica a continuación:

Inyectar por separado en el cromatógrafo 20 µl de *Solución muestra B* y 20 µl de *Solución estándar B*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. El cromatograma de la *Solución muestra B* debe presentar sólo picos principales que corresponden a los picos en el cromatograma de la *Solución estándar B* con un tiempo de retención mayor de 3 minutos.

Las respuestas de los picos en el cromatograma de la *Solución muestra B* no deben ser mayores que las de los picos correspondientes en el cromatograma de la *Solución estándar B*.

Sustancias solubles en hexano - Transferir 5 g del material a ensayar a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada. Agregar 50 ml de hexano y calentar a reflujo en un baño de agua con agitación constante durante 4 horas. Enfriar en un baño de hielo (se puede formar un gel). Adaptar una camisa de enfriamiento, llena de agua helada, a un filtro de vidrio sinterizado de porosidad media adaptado con un dispositivo que permita aplicar presión durante la filtración.

Dejar enfriar el filtro durante 15 minutos. Filtrar la solución de hexano aplicando una presión de 27 kPa sin lavar el residuo; el tiempo de filtración no debe exceder de 5 minutos. Evaporar 20 ml de la solución a sequedad. Secar a 100 °C durante 1 hora. El residuo no debe pesar más de 40 mg (2 %) para copolímeros empleados en la fabricación de envases y no más de 0,1 g (5 %) para copolímeros empleados para tubos.

Residuo de ignición <270> - No más de 1,2 %, determinado sobre 5,0 g.

VALORACION

Transferir de 250 mg a 1 g del material a ensayar, según el contenido de acetato de vinilo del copolímero a ensayar, a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato de boca esmerilada de 300 ml. Agregar 40 ml de xileno. Calentar a reflujo con agitación durante 4 horas. Dejar enfriar, con agitación continua, hasta que comience la precipitación. Agregar lentamente 25,0 m1 de una solución de hidróxido de potasio alcohólico preparada disolviendo 6,6 g de hidróxido de potasio en 50 ml de agua y diluyendo a 1 litro con etanol. Calentar a reflujo con agitación durante 3 horas. Dejar enfriar con agitación continua, lavar el refrigerante con 50 ml de agua y agregar al erlenmeyer 30,0 ml de ácido sulfúrico 0,1 N. Transferir el contenido del erlenmeyer a un vaso de precipitados de 400 ml. Lavar el erlenmeyer con dos porciones de 50 ml de una solución de sulfato de sodio anhidro al 20 % y tres porciones de 20 ml de agua. Agregar todos los lavados al vaso de precipitados que contiene la solución inicial. Titular el exceso de ácido sulfúrico con hidróxido de sodio 0,1 N, determinando el punto final potenciométricarnente (ver *780. Volumetría*). Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de ácido sulfúrico 0,1 N es equivalente a 8,609 mg de acetato de vinilo.

Envases plásticos estériles para sangre humana o hemoderivados

Los envases plásticos para la recolección, almacenamiento, procesamiento y administración de sangre humana y hemoderivados se fabrican de uno o más polímeros y, si el caso así lo requiere, con aditivos permitidos. En condiciones normales de uso, los materiales no deben liberar monómeros u otras sustancias, en cantidades que puedan ser nocivas o causen modificaciones anormales a la sangre.

Los envases pueden contener soluciones anticoagulantes.

Cada envase está equipado con accesorios apropiados para facilitar su uso. El envase puede estar constituido por una unidad o estar conectado por uno o más tubos a uno o más envases complementarios para permitir la separación de los componentes sanguíneos en un sistema cerrado.

A menos que se especifique de otro modo en *Envases plásticos estériles para sangre humana y hemoderivados*, los materiales de los envases deben cumplir con los requisitos para *Poli (cloruro de vinilo) plastificado para envases destinados a soluciones acuosas para perfusión intravenosa*.

CARACTERÍSTICAS

El envase debe ser suficientemente transparente para permitir un examen visual apropiado de su contenido antes y después de ser llenado con sangre y debe ser suficientemente flexible para ofrecer una mínima resistencia durante el llenado y vaciado bajo condiciones normales de uso. El envase no debe contener más de 5 ml de aire.

ENSAYOS

Solución S_1.- Llenar el envase con 100 ml de Solución fisiológica libre de piretógenos (SR) estéril. Cerrar el envase y calentarlo en autoclave, manteniendo la temperatura a 110 °C durante 30 minutos.

Si el envase a ensayar contiene una solución anticoagulante, vaciarlo previamente, y lavarlo con 250 ml de *Agua para Inyectables* a 20 ± 1 °C en varias porciones, descartando los lavados.

Solución S_2 - Introducir en el envase un volumen de *Agua para Inyectables* igual al volumen de solución de anticoagulante. Cerrar el envase y calentarlo en autoclave manteniendo la temperatura a 110 °C durante 30 minutos. Enfriar, agregar suficiente cantidad de *Agua para Inyectables* como para llenar el envase hasta su capacidad nominal.

Si el envase a ensayar contiene una solución anticoagulante, vaciarlo previamente y lavarlo según se indicó anteriormente para la *Solución S_1*.

Resistencia a variaciones de temperatura - Colocar el envase en una cámara apropiada la cual posee una temperatura inicial entre 20 y 23 °C. Enfriarlo rápidamente a una temperatura de – 80 °C y mantenerlo a esa temperatura durante 24 horas. Elevar la temperatura a 50 °C y mantenerla durante 12 horas. Dejar enfriar a temperatura ambiente. El

envase deberá cumplir con los ensayos para la *Resistencia a la centrifugación*, *Resistencia al estiramiento*, *Fuga*, *Permeabilidad al vapor de agua*, *Vaciado bajo presión* y *Velocidad de llenado*, siguiendo las técnicas descriptas en este capítulo.

Resistencia a la centrifugación -

Solución indicadora - Disolver, con calentamiento suave, 50 mg de azul de bromofenol en 3,73 ml de hidróxido de sodio 0,02 M y diluir a 100 ml con agua. -

Procedimiento - Introducir en el envase un volumen de agua acidificada, por el agregado de 1 ml de solución de ácido clorhídrico diluido, en cantidad suficiente para alcanzar su capacidad nominal. Envolver el envase con un papel absorbente impregnado con *Solución indicadora* diluida 1 en 5. Secar y centrifugar durante 10 minutos a 5.000 g. No se debe producir ninguna fuga, revelada por el papel indicador, ni ninguna distorsión permanente.

Resistencia al estiramiento - Introducir en el envase un volumen de agua acidificada por el agregado de 1 ml de solución de ácido clorhídrico diluido, en suficiente cantidad para alcanzar su capacidad nominal. Suspender el envase por el dispositivo de sujeción desde el extremo opuesto al tubo de salida, aplicar a lo largo del eje del tubo una fuerza de 20 N (2,05 kgf). Mantener la tracción durante 5 segundos. Repetir el ensayo aplicando la fuerza a cada una de las partes que se emplean para llenar y vaciar el envase. No deberá producirse rotura o deterioro apreciable.

Ensayo de fuga - Colocar el envase, que se ha sometido al ensayo de *Resistencia al estiramiento*, entre dos placas recubiertas con papel absorbente impregnado con *Solución indicadora* diluida 1 en 5, empleada en el ensayo de *Resistencia a la centrifugación* y secar. Aplicar, progresivamente, una fuerza a las placas de forma que la presión interna del envase alcance 67 kPa en el término de 1 minuto. Mantener la presión durante 10 minutos. No se debe percibir ninguna señal de fuga sobre el papel indicador.

Permeabilidad al vapor de agua - Para envases que contienen solución anticoagulante, llenar con un volumen de Solución fisiológica (SR), similar a la cantidad de sangre a contener.

Para el caso de los envases vacíos, llenar con la mezcla de solución de anticoagulante indicada y Solución fisiológica (SR). Cerrar el envase, pesarlo y almacenarlo a 5 ± 1 °C en una atmósfera con una humedad relativa de 50 ± 5 % durante 21 días. Al final de este período la pérdida de peso no deber ser mayor de 1 %.

Vaciado bajo presión - Llenar el envase con un volumen de agua a 5 ± 1 °C, equivalente a su capacidad nominal. Adosar a uno de los conectores, un equipo de transfusión sin cánula intravenosa. Comprimir el envase de manera tal que durante el vaciado se mantenga una presión interna de 40 kPa. El envase se debe vaciar en menos de 2 minutos.

Velocidad de llenado - Conectar el envase, por intermedio del tubo de transferencia con su correspondiente aguja a un depósito que contiene una cantidad apropiada de una solución con una viscosidad similar a la de la sangre, como por ej., una solución de sacarosa con una concentración de 335 g/1 a 37 °C. Mantener la presión interna del depósito a 9,3 kPa, estando al mismo nivel la base del mismo y la parte superior del envase. El volumen de líquido que fluye dentro del envase en 8 minutos no debe ser menor que la capacidad nominal del envase.

Transparencia -

Solución de sulfato de hidracina - Disolver 1,0 g de sulfato de hidracina en agua y diluir a 100 ml con el mismo solvente. Dejar reposar durante 4 a 6 horas.

Solución de hexametilentetramina - Transferir 2,5 g de hexametilentetramina a un matraz de 100 ml con tapón esmerilado. Agregar 25 ml de agua y disolver.

Suspensión opalescente primaria - Agregar a la *Solución de hexametilentetramina* contenida en el matraz, 25 ml de *Solución de sulfato de hidracina*. Mezclar y dejar reposar durante 24 horas. Esta suspensión es estable durante 2 meses cuando se la almacena en envases de una superficie interna perfectamente lisa. La suspensión no debe adherirse y debe agitarse cuidadosamente antes de ser empleada.

Procedimiento - Introducir al envase vacío un volumen, equivalente a su capacidad nominal, de la *Suspensión opalescente primaria* diluida de manera de obtener una absorbancia de 0,37 a 0,43 a 640 nm (el factor de dilución es de 1 en 16). La turbidez de la suspensión debe ser perceptible cuando se observa a través del envase, en comparación con un envase de similares características lleno de agua en las mismas condiciones.

Efectos hemolíticos en sistemas de pH regulado - (ver *470. Espectrofotometría ultravioleta y visible*).

Solución reguladora madre - Disolver 90,0 g de cloruro de sodio, 34,6 g de fosfato dibásico de sodio y 2,43 g de fosfato monobásico de sodio en agua y diluir a 1 litro con el mismo solvente.

Solución reguladora A_0 - A 30,0 ml de la *Solución reguladora madre* agregar 10,0 ml de agua.

Solución reguladora B_0- A 30,0 ml de la *Solución reguladora madre* agregar 20,0 ml de agua.

Solución reguladora C_0 - A 15,0 ml de la *Solución reguladora madre* agregar 85,0 ml de agua.

Solución A_1 - Mezclar 3,0 ml de *Solución reguladora A_0* y 12,0 ml de agua.

Solución B_1 - Mezclar 4,0 ml de *Solución reguladora-B_0* y 11,0 ml de agua.

Solución C_1 - Mezclar 4,75 ml de *Solución reguladora C_0* y 10,25 ml de agua.

Procedimiento - Transferir 1,4 ml de la *Solución S_2* a cada uno de tres tubos de centrífuga. Al tubo I agregarle 0,1 ml de *Solución reguladora A_0*, al tubo II agregarle 0,1 ml de *Solución reguladora B_0* y al tubo III agregarle 0,1 ml de *Solución reguladora C_0*. Agregar a cada tubo 0,02 ml de sangre humana fresca heparinizada, mezclar bien y calentar en un baño de agua a 30 ± 1 °C durante 40 minutos. Emplear sangre recolectada 3 horas antes como máximo o sangre recolectada con solución anticoagulante de citrato-fosfato-dextrosa 24 horas antes como máximo.

A los tubos I, II y III agregar 1,5 ml de *Solución A_1*, *Solución B_1* y *Solución C_1*, respectivamente. Al mismo tiempo y de la misma manera, preparar otros tres tubos, reemplazando *Solución S_2* por agua, estos tubos servirán como control. Centrifugar simultáneamente los tubos a ensayar y los de control a exactamente 2500 g en la misma centrífuga horizontal durante 5 minutos. Determinar las absorbancias, con un espectrofotómetro apropiado, en celdas de 1 cm, a la longitud de onda de 540 nm, empleando la *Solución reguladora madre* como blanco. Calcular el porcentaje de hemólisis por la fórmula siguiente:

$$\frac{A_{\text{exp}}}{A_{100}}\ 100$$

en la cuál A_{100}, es la absorbancia del tubo III y A_{exp} son las absorbancias de los tubo I ó II, o las correspondientes a los tubos controles.

La solución en el tubo I debe dar un porcentaje de hemólisis no mayor a 10 % y el porcentaje de hemólisis de la solución en el tubo II no debe diferir en más de 10 % al del tubo control correspondiente.

Esterilidad <370> - Introducir asépticamente en el envase 100 ml de Solución fisiológica (SR) estéril y agitar el envase para asegurar que la superficie interna se moje completamente. Filtrar el contenido del envase a través de un filtro de membrana y colocar la membrana en un medio de cultivo apropiado. Los envases deben cumplir con el ensayo de esterilidad.

Piretógenos <340> - Inyectar 10 ml de la *Solución S_1* por cada kg de peso del conejo. La *Solución S_1* debe cumplir con los requisitos establecidos.

Reactividad biológica <380> - Realizar el ensayo según se indica en *380. Ensayo de reactividad biológica in vitro.*

Acondicionamiento –

Los envases están contenidos en sobres protectores. Al separarse el envase de su sobre protector, el mismo no debe evidenciar fugas ni crecimiento de microorganismos. El sobre protector debe ser suficientemente resistente para soportar la manipulación normal.

El sobre protector debe estar sellado de tal manera que no pueda abrirse y cerrarse nuevamente sin evidenciar la rotura del mismo.

Rotulado - Debe cumplir con las normas vigentes.

Envases plásticos vacíos estériles de poli(cloruro de vinilo) plastificado para sangre humana o hemoderivados

ENSAYOS

Deberán cumplir con los ensayos para *Envases plásticos estériles para sangre humana o hemoderivados* y con los siguientes ensayos para detectar materia extraíble.

Solución de referencia - Transferir *Agua para Inyectables* a un erlenmeyer de vidrio al borosilicato y calentar en autoclave a 110 °C durante 30 minutos.

Sustancias reductoras - Inmediatamente después de la preparación de la *Solución S_2*, transferir al erlenmeyer al borosilicato una cantidad correspondiente al 8 % de la capacidad nominal del envase. Simultáneamente preparar un blanco empleando un volumen igual de la *Solución de referencia* recientemente preparada en otro erlenmeyer de vidrio al borosilicato. A cada solución agregar 20,0 ml de permanganato de potasio 0,002 M y 1 ml de ácido sulfúrico diluido. Dejar reposar durante 15 minutos protegido de la luz.

A cada solución agregar 0,1 g de ioduro de potasio. Dejar reposar durante 5 minutos protegido de la luz y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR) como indicador. La diferencia entre las dos titulaciones no debe ser mayor de 2,0 ml.

Acidez o alcalinidad - A un volumen de *Solución S_2*, equivalente al 4 % de la capacidad nominal del envase, agregarle 0,1 ml de fenoftaleína (SR). La solución permanece incolora. Agregar 0,4 ml de una solución de hidróxido de sodio 0,01 M. La

solución toma color rosado. Agregar 0,8 ml de ácido clorhídrico 0,01 M y 0,1 ml de rojo de metilo (SR 1). La solución se torna de color anaranjado rojizo o rojo.

Cloruro -

Solución de cloruro de sodio - Disolver en agua una cantidad de cloruro de sodio, equivalente a 0,824 g de CINa, y diluir a 1 litro con el mismo solvente. Diluir 1 ml de esta solución a 100 con agua inmediatamente antes de usar (5 ppm de Cl).

Procedimiento - A 15 ml de *Solución S_2* agregar 1 ml de ácido nítrico diluido y volcar la mezcla de una sola vez en un tubo de Nessler que contenga 1 ml de nitrato de plata (SR). Luego de dejar en reposo esta solución durante 5 minutos protegido de la luz, no debe presentar una turbidez mayor que la de una solución preparada simultáneamente, mezclando 1,2 ml de *Solución de cloruro de sodio* con 13,8 ml de agua (0,4 ppm).

Amonio -

Solución alcalina de tetraiodoniercurato de potasio - Disolver 11 g de ioduro de potasio y 15 g de ioduro de mercurio (II) en agua y diluir a 100 ml con el mismo solvente. Mezclar extemporáneamente 1 volumen de esta solución y 1 volumen de solución de hidróxido de sodio de 250 g/l.

Solución de amonio - Disolver en agua una cantidad de cloruro de amonio, equivalente a 741 mg de NH_4Cl, y diluir a 1 litro con el mismo solvente. Diluir 1 ml de esta solución a 100 con agua. Tomar 2 volúmenes de la solución anterior y diluir a 5 volúmenes con agua inmediatamente antes de usar (1 ppm de NH_4).

Solución diluida de hidróxido de sodio - Disolver 8,5 g de hidróxido de sodio en agua y diluir a 100 ml con agua.

Procedimiento - Diluir 5 ml de *Solución S_2* a 14 ml con agua, alcalinizar si es necesario con *Solución diluida de hidróxido de sodio* y diluir a 15 ml con agua. Agregar 0,3 ml de *Solución alcalina de tetraiodomercurato de potasio*. Después de 5 minutos, el color amarillo no debe ser más intenso que el producido por una solución obtenida mezclando 10 ml de *Solución de amonio* con 5 ml de agua y 0,3 ml de *Solución alcalina de tetraiodomercurato de potasio*. (2 ppm).

Residuo por evaporación - Evaporar a sequedad 100 ml de *Solución S_2* en un vaso de precipitados de vidrio al borosilicato, previamente calentada a 105 °C. Evaporar a sequedad, en las mismas condiciones 100 ml de la *Solución de referencia*. Secar hasta peso constante entre 100 y 105 °C. El residuo de la *Solución S_2* no debe pesar más de 3 mg, comparado con la *Solución de referencia*.

Absorbancia - Determinar la absorbancia de la *Solución S_2* a longitudes de onda entre 230 a 360 nm, empleando la *Solución de referencia* como blanco. A longitudes de onda entre 230 y 250 nm, la absorbancia no debe ser mayor de 0,30. A longitudes de onda entre 251 y 360 mn, la absorbancia no debe ser mayor de 0,10.

Ftalato de bis(2-etilhexilo) extraíble -

Solvente de extracción - Emplear alcohol diluido con agua con una densidad relativa entre 0,9389 y 0,9395 (ver *160. Determinación de la densidad relativa*).

Solución madre del estándar - Disolver 100 mg de ftalato de bis(2-etilhexilo) en *Solvente de extracción* y diluir a 100,0 ml con el mismo solvente.

Soluciones estándar - Transferir 20,0; 10,0; 5,0; 2,0 y 1,0 ml de *Solución madre del estándar* a sendos matraces aforados de 100 ml y diluir a volumen con *Solvente de extracción* para obtener las *Soluciones estándar A*, *B*, *C*, *D* y *E*, respectivamente.

Determinar las absorbancias; con un espectrofotómetro apropiado, de las *Soluciones estándar* a la longitud de 272 nm, empleando *Solvente de extracción* como blanco. Trazar una recta de absorbancia en función de la concentración de ftalato de bis(2-etilhexilo).

Procedimiento de extracción - Mediante el empleo del adaptador correspondiente, llenar el envase vacío con un volumen de *Solvente de extracción* previamente calentado a 37 °C, igual a la mitad del volumen nominal. Expulsar el aire completamente del envase y sellar el tubo de salida. Sumergir el envase lleno en posición horizontal en un baño de agua a 37 ± 1 °C durante 60 ± 1 minuto sin agitar. Retirar el envase del baño de agua, invertirlo suavemente 10 veces y transferir el contenido a un matraz. Inmediatamente medir la absorbancia a 272 nm, empleando *Solvente de extracción* como blanco.

Determinar la concentración de ftalato de bis(2-etilhexilo), en mg por cada 100 ml de extracto, a partir de la recta de calibración.

La concentración no debe exceder:

- 10 mg por cada 100 ml para envases cuyo volumen nominal sea mayor o igual de 300 ml, pero menor de 500 ml;
- 13 mg por cada 100 ml para envases cuyo volumen nominal sea mayor de 150 ml, pero menor de 300 ml;
- 14 mg por cada 100 ml para envases cuyo volumen nominal sea menor o igual 150 ml.

Acondicionamiento y rotulado - Ver *Envases plásticos estériles para sangre humana o hemoderivados*.

Envases plásticos estériles de poli(cloruro de vinilo) plastificado para sangre humana que contienen solución, anticoagulante.

Los envases plásticos estériles de poli(cloruro de vinilo) para sangre humana que contienen una solución anticoagulante o soluciones conservadoras deberán cumplir con las monografías correspondientes. Estos envases se emplean para la recolección, almacenamiento y administración de sangre. Antes de ser llenados deberán cumplir con la descripción y características dadas en *Envases plásticos vacíos estériles de poli(cloruro de vinilo) plastificado para sangre humana o hemoderivados*.

A menos que se especifique de otro modo en *Envases plásticos estériles para sangre humana o hemoderivados*, la naturaleza y composición de los materiales de los envases deben cumplir con los requisitos para *Poli(cloruro de vinilo) plastificado para envases destinados a sangre humana o hemoderivados* y para *envases destinados a soluciones acuosas para perfusión intravenosa*.

ENSAYOS

Los envases deben cumplir con los ensayos para *Envases plásticos estériles para sangre humana o hemoderivados* y con los siguientes ensayos para medir el volumen de solución anticoagulante y para detectar materia extraíble.

Volumen de solución anticoagulante - Transferir completamente el contenido del envase a una probeta. El volumen no debe diferir en más de ± 10 % del volumen declarado.

Absorbancia - Determinar la absorbancia de la solución anticoagulante, extraída del envase, entre 250 y 350 nm, empleando como blanco una solución anticoagulante de la misma composición que no ha estado en contacto con el material plástico. La absorbancia, a la longitud de 280 nm, no debe ser mayor de 0,5.

Ftalato de bis(2-etilhexilo) extraíble - Retirar cuidadosamente la solución anticoagulante por medio del tubo de transferencia empleando un embudo adaptado a dicho tubo, llenar completamente el envase con agua, dejar en contacto durante 1 minuto, y presionar suavemente el envase. Después vaciarlo completamente y repetir el lavado. El envase vacío y lavado debe cumplir con el ensayo *Ftalato de bis(2-etilhexilo)* extraíble descripto en *Envases plásticos vacíos estériles de poli(cloruro de vinilo) para sangre humana o hemoderivados*.

Acondicionamiento y rotulado - Ver *Envases plásticos estériles para sangre humana o hemoderivados*.

Envases plásticos para soluciones acuosas para perfusión intravenosa

Los envases plásticos destinados a soluciones acuosas para perfusión intravenosa deben cumplir con los siguientes ensayos.

ENSAYOS

Solución S - Llenar un envase hasta su capacidad nominal con agua y taparlo. Colocar el envase en un autoclave a una temperatura de 121 °C, durante 30 minutos. Si el calentamiento a 121 °C produce el deterioro del envase, calentar a 100 °C durante 2 horas. Emplear la solución, dentro de las 4 horas de preparada.

Blanco - Preparar un blanco calentando agua en un erlenmeyer de vidrio al borosilicato tapado, a la temperatura y por el tiempo empleado para la preparación de la *Solución S*.

Aspecto de la solución S - Debe ser transparente e incolora.

Acidez o alcalinidad - A un volumen de *Solución S* correspondiente al 4 % de la capacidad nominal del envase agregar 0,1 ml de fenolftaleína (SR). La solución debe ser incolora. Agregar 0,4 ml de hidróxido de sodio 0,01 M. La solución debe tomar una coloración rosa. Agregar 0,8 ml de ácido clorhídrico 0,01 M y 0,1 ml de rojo de metilo (SR 1). La solución debe ser de color anaranjado rojizo o rojo.

Absorbancia - Determinar la absorbancia de la *Solución S* entre 230 y 360 nm, no debe ser mayor de 0,20.

Sustancias reductoras - A 20,0 ml de *Solución S* agregar 1 ml de ácido sulfúrico diluido y 20,0 ml de solución de permanganato de potasio 0,002 M. Calentar a ebullición durante 3 minutos y enfriar inmediatamente. Agregar 1 g de ioduro de potasio y titular inmediatamente con tiosulfato de sodio 0,01 N, empleando 0,25 ml de almidón (SR) como indicador. Realizar una determinación con un blanco y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre los volúmenes de titulación no debe ser mayor de 1,5 ml.

Transparencia -

Solución de sulfato de hidracina - Disolver 1,0 g de sulfato de hidracina en agua y diluir a 100 ml con el mismo solvente. Dejar reposar durante 4 a 6 horas.

Solución de hexametilentetramina - Transferir 2,5 g de hexanetilentetramina a un matraz de 100 ml con tapón esmerilado. Agregar 25 ml de agua y disolver.

Suspensión opalescente primaria - Agregar a la *Solución de hexametilentetramina* contenida en el matraz, 25 ml de *Solución de sulfato de hidracina*. Mezclar y dejar reposar durante 24 horas. Esta

suspensión es estable durante 2 meses cuando se la almacena en envases de vidrio de superficies internas lisas. La suspensión no debe adherirse y debe mezclarse cuidadosamente antes de ser empleada.

Procedimiento - Llenar el envase empleado anteriormente para la preparación de la *Solución S*, con un volumen de *Suspensión opalescente primaria*, igual a la capacidad nominal del envase, diluida 1 en 200 para un envase de polietileno o polipropileno y 1 en 400 para otros tipos de envases. La opalescencia de la suspensión debe ser perceptible cuando se observa a través del envase, en comparación con un envase de similares características lleno en las mismas condiciones pero con agua.

Acondicionamiento - El envase deberá ser acondicionado en un sobre protector.

Rotulado - Debe cumplir con las normas vigentes.

430. ENVASES DE VIDRIO

A continuación se describen los ensayos para la caracterización de la calidad de los envases primarios de vidrio destinados para uso farmacéutico.

Existen diversos tipos de envases:

Ampollas: son envases de vidrio de paredes finas en los que el cerrado, después del llenado, se realiza por fusión del vidrio. El contenido se extrae en una sola vez, previa apertura de las mismas.

Frascos, viales, jeringas y carpules: son envases cilíndricos, de paredes de grosor apropiado, cuyos cierres son de vidrio o de otro material, como por ej., materiales plásticos o elastoméricos. El contenido se extrae en una o varias dosis.

Envases para contener sangre y Hemoderivados: son envases cilíndricos, de paredes más o menos gruesas, de vidrio neutro, incoloro y de capacidad variable.

La estabilidad química de los envases de vidrio para uso farmacéutico es expresada por la resistencia hidrolítica, es decir, la resistencia para liberar sustancias minerales solubles en agua bajo condiciones específicas de contacto entre la superficie interna del envase o el polvo del vidrio y el agua. La resistencia hidrolítica es evaluada por titulación de la alcalinidad liberada.

El vidrio neutro es un vidrio al borosilicato que contiene cantidades importantes de piroborato de sodio, óxidos de aluminio o a lcalino térreos. Debido a su composición, tiene una alta resistencia a los cambios térmicos y una alta resistencia hidrolítica.

El vidrio sódico-cálcico es un vidrio de sílice que contiene óxidos de metales alcalinos y alcalino térreos principalmente óxido de sodio y óxido de calcio, respectivamente. Debido a su composición, este tipo de vidrio posee moderada resistencia hidrolítica.

Clasificación de los envases de vidrio según su resistencia hidrolítica:

-Tipo I: son envases de vidrio neutro de alta resistencia hidrolítica; en general son apropiados para todas las preparaciones, sean o no para uso parenteral, para sangre y hemoderivados.

-Tipo II: son envases de vidrio sódico-cálcico de alta resistencia hidrolítica; en general son apropiados para las preparaciones parenterales acuosas neutras o ácidas.

-Tipo III: son envases de vidrio sodico-cálcico de moderada resistencia hidrolítica; en general son apropiados para preparaciones parenterales no acuosas, polvos para uso parenteral y preparaciones no parenterales.

-Tipo IV: son envases de vidrio sodico-cálcico de baja resistencia hidrolítica; en general son apropiados para preparaciones sólidas, líquidas o semisólidas que no son para uso parenteral.

En todos los casos, la elección de un envase primario debe ser el resultado de un estudio de estabilidad llevado a cabo en condiciones apropiadas. El elaborador de un producto farmacéutico es el responsable de garantizar la compatibilidad del envase elegido con la preparación que contiene.

RESISTENCIA HIDROLÍTICA

Materiales y reactivos

Para este ensayo es necesario emplear un autoclave; tamices N° 710, 425 y 250 (llamados a, b y c, respectivamente); dos erlenmeyers de vidrio resistente de 250 ml; un martillo de 900 g; un imán permanente; un desecador y un mortero con pilón, ambos de acero y construidos según las especificaciones dadas en la *Figura.*

Solución indicadora de rojo de metilo - Disolver 50 mg de rojo de metilo en una mezcla preparada con 50 ml de alcohol y 1,86 ml de hidróxido de sodio 0,1 M. Diluir a 100 ml con agua. El cambio de color se produce a pH entre 4,4 y 6,0.

Resistencia hidrolítica del vidrio pulverizado

La magnitud del ataque se determina por la cantidad de álcali liberado por el vidrio, bajo condiciones específicas.

Solución muestra - Lavar perfectamente con agua los envases destinados al ensayo y secarlos en estufa. Triturar aproximadamente 100 g de vidrio procedentes de tres envases como mínimo, de modo que la dimensión de los fragmentos obtenidos no sobrepase los 25 mm. Transferir una parte de la muestra al mortero, insertar el pilón y golpear fuertemente una sola vez. Transferir el contenido del mortero al tamiz superior (a). Repetir la operación con el resto de la muestra. Pasar rápidamente por los tamices y recolectar los fragmentos que quedan sobre los tamices (a) y (b). Someter estos fragmentos a u na nueva trituración. Repetir la operación hasta que sólo queden sobre el tamiz (a) 20 g de vidrio aproximadamente. Rechazar esta fracción, así como la que ha pasado a través del tamiz (c). Seguidamente, someter los tamices a ag itación manual o mecánica, durante 5 minutos.

Conservar para el ensayo la fracción de polvo de vidrio que ha pasado a través del tamiz (b) y que es retenida por el tamiz (c). Eliminar mediante un imán las partículas metálicas que pueda contener el polvo. A continuación, transferir aproximadamente 22 g del polvo de vidrio a un erlenmeyer y lavarlo con 60 ml de acetona, agitar y decantar el líquido sobrenadante. Repetir esta operación 5 veces. Extender el polvo sobre un cristalizador, dejar que la acetona se evapore, secar en estufa a 1 10 °C durante 20 minutos y dejar enfriar.

Transferir 20 g del polvo de vidrio a un erlenmeyer de 250 ml. Agregar 100 ml de agua y pesar. En un erlenmeyer similar al anterior, transferir 100 ml de agua, que se emplearán como blanco y pesar. Cubrir los envases con cristalizadores de vidrio neutro o con hojas de aluminio lavada con agua. Asegurar la distribución uniforme del polvo de vidrio sobre el fondo del erlenmeyer. Colocar los erlenmeyers en el autoclave y mantenerlos a 1 21 °C durante 30 minutos. Enfriar los erlenmeyers, destaparlos, secarlos cuidadosamente y llevarlos a sus pesos originales mediante el agregado de agua.

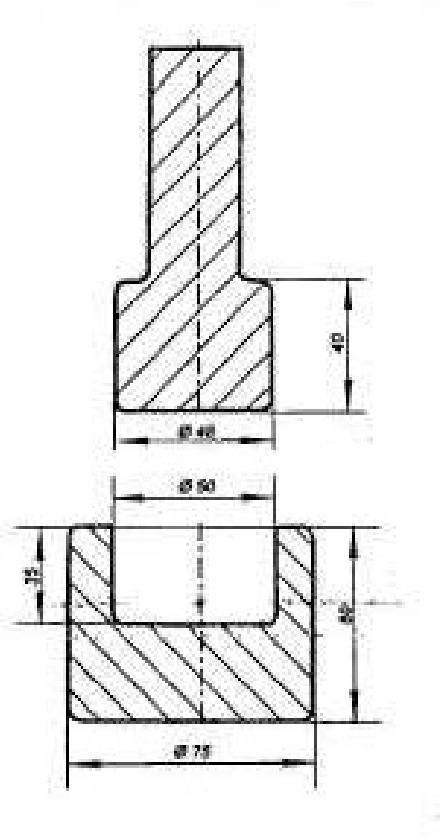


Figura 1. Mortero para pulverizar vidrio (las dimensiones son en mm).

Procedimiento - Transferir 50 ml del líquido sobrenadante transparente de la *Solución muestra*, equivalente a 10,0 g del polvo de vidrio, a un erlenmeyer de 250 ml. Agregar 50 ml de agua a un erlenmeyer idéntico, que será empleado como blanco. Agregar a cad a erlenmeyer 0,1 ml de Solución indicadora de rojo de metilo y titular el blanco con ácido clorhídrico 0,01 N. Titular la *Solución muestra* tomando como punto final el color obtenido en la titulación del blanco y hacer las correcciones necesarias. Expresar los resultados en función del tipo de vidrio, en ml de ácido clorhídrico 0,01 N por 10,0 g de vidrio: el valor obtenido no debe ser mayor que el indicado en la *Tabla 1*.

Tabla 1.

Tipo de vidrio	Cantidad máxima de ácido clorhídrico 0,01 N (ml)
I	2
II-III	17
IV	30

Resistencia hidrolítica de la superficie del vidrio

Procedimiento - La *Tabla 2* indica la cantidad de envases a emplear según su capacidad y el volumen de solución empleado en la titulación.

Tabla 2.

Capacidad nominal (ml)	N° de envases	Volumen de solución empleado para la titulación (ml)
≤ 3	no menor de 10	25
> 3 ≤ 30	no menor de 5	50
> 30	No menor de 3	100

Inmediatamente antes del ensayo, lavar por lo menos 3 veces cada envase con agua, a temperatura ambiente. Llenar los envases en su totalidad con agua, vaciarlos y calcular el volumen de derrame promedio.

Llenar las ampollas con agua hasta alcanzar el nivel del hombro y sellarlas. En el caso de los frascos, llenarlos al 90 % de su volumen de derrame y taparlos con vasos de precipitados de vidrio al borosilicato lavados con agua. Colocar los envases en el autoclave y calentar a 121 ± 1 °C durante 60 minutos, reducir el calor de modo que el autoclave se enfríe y la presión se normalice en un tiempo entre 38 y 46 minutos, evitando la formación de vacío.

En un tiempo no mayor de 1 hora después de haber sacado los envases del autoclave, combinar los líquidos de los envases, mezclarlos y medir con una probeta el volumen especificado en la *Tabla 2* para cada caso, transfiriéndolo a u n erlenmeyer. Agregar el mismo volumen de agua en un erlenmeyer idéntico, que será empleado como blanco. Agregar a cada erlenmeyer 0,05 ml de *Solución indicadora de rojo de metilo* cada 25 ml de líquido y titular el blanco con ácido clorhídrico 0,01 N. Titular la *Solución muestra* tomando como punto final el color obtenido en la titulación del blanco y hacer las correcciones necesarias. La diferencia entre ambas titulaciones representa el volumen de ácido clorhídrico 0,01 N requerido para el volumen empleado de la *Solución muestra*.

Calcular el volumen necesario para 100 ml y referir los resultados a los límites de la *Tabla 3*.

Tabla 3.

Capacidad del envase correspondiente al 90 % del volumen de derrame promedio (ml)	Cantidad máxima en ml de ácido clorhídrico 0,01 N por 100 ml de *Solución muestra*	
	Tipo I y II	Tipo III
≤ 1	2	20
> 1 y ≤ 2	1,8	17,6

Tabla 3. Continuación

Capacidad del envase correspondiente al 90 % del volumen de derrame promedio (ml)	Cantidad máxima en ml de ácido clorhídrico 0,01 N por 100 ml de *Solución muestra*	
	Tipo I y II	Tipo III
> 2 y ≤5	1,3	13,2
> 5 y ≤10	1	10,2
> 10 y ≤ 20	0,8	8,1
> 20 y ≤50	0,6	6,1
> 50 y ≤ 100	0,5	4,8
> 100 y ≤ 200	0,4	3,8
> 200 y ≤500	0,3	2,9
> 500	0,2	2,2

CONTENIDO DE ARSÉNICO PARA VIDRIOS DE TIPO I, II Y III

Determinar el contenido de arsénico (ver *540. Límite de arsénico*) sobre una alícuota de 35 ml del líquido obtenido en *Solución muestra* en el ensayo de *Resistencia hidrolítica de la superficie del vidrio*: no debe contener más de 0,1 ppm.

TRANSMISIÓN DE LUZ

Solución muestra - Cortar el envase con una sierra circular de videa o similar. En el caso de los envases de vidrio soplado, elegir aquellas secciones que representan el espesor promedio de la pared y recortar al tamaño apropiado para ser colocadas en el espectrofotómetro. Lavar y secar evitando rayar la superficie. Si la muestra es tan pequeña que no cubre la abertura del soporte de la celda, tapar la parte faltante con papel opaco o con tela adhesiva. Limpiar la muestra y colocarla con ayuda de alguna cera u otro medio apropiado. La muestra debe ser colocada de tal manera que el haz de luz sea perpendicular a la superficie de la misma.

Límites - Las lecturas de luz transmitida a través del vidrio tipo I, II y III no deben ser mayores que los valores indicados en la *Tabla 4*.

Las lecturas de luz transmitida a través del vidrio tipo IV no deben ser mayores del 10 % de transmitancia, independientemente del tamaño del envase, en cualquier longitud de onda entre 290 y 450 nm.

Tabla 4. Límites de luz transmitida para vidrio tipo I, II y III.

Tamaño nominal (ml)	Máxima transmisión de luz permitida (%) Entre 290 y 450 nm	
	Envases cerrados por fusión	Envases con tapa o tapón
1	50	25
2	45	20
5	40	15
10	35	13
20	30	12
≥ 50	15	10

[NOTA: cualquier envase de tamaño intermedio a los mencionados anteriormente debe tener una transmisión igual o menor que la del envase de tamaño inmediato superior en la *Tabla 4*.]

435. ENVASES PARA PRODUCTOS MÉDICOS ESTÉRILES

Ver *435. Envases para productos Médicos Estériles* en *Apartado de Productos Médicos* en *Volumen III.*

440. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION Y EMISION ATOMICA

Estas técnicas se emplean para la determinación de la concentración de un elemento metálico en una muestra. La determinación se efectúa mediante la medida de la intensidad de absorción o emisión de luz, producida por el vapor atómico del elemento generado a partir de la muestra en solución, realizada a una longitud de onda específica para cada elemento.

Absorción atómica

Aparato - Consta de una fuente de radiación, un generador de átomos del elemento a analizar (llama, horno, generador de vapor, etc.) que permite introducir el analito en el paso óptico, un monocromador y un detector.

Generación de vapores atómicos -

Llama - Este sistema emplea un nebulizador para generar una niebla a partir de la solución del analito. Por evaporación del solvente cerca de la base de la llama, se obtienen pequeñas partículas sólidas, las que son fundidas y vaporizadas, disociándose sus moléculas constituyentes para producir átomos libres en estado basal.

El tipo de llama se debe seleccionar de acuerdo con la clase de elemento a analizar:

a) Para elementos fácilmente atomizables como cobre, plomo, potasio y sodio se debe emplear llama de aire-acetileno.

b) Para elementos que forman compuestos refractarios y que no se descomponen en la llama aire-acetileno como aluminio, silicio y tungsteno se debe emplear llama de óxido nitroso-acetileno.

c) Para determinar elementos tales como arsénico, calcio, cromo, magnesio, molibdeno, osmio, selenio o estroncio, pueden ser empleados indistintamente ambos tipos de llama.

Horno de grafito - En éste sistema, la solución del analito es atomizada de una sola vez en un tubo de grafito, donde se seca y luego se calcina por incremento de la temperatura permitiendo eliminar, tanto como sea posible, el material de la matriz sin pérdida del analito. La posterior vaporización de los residuos provenientes del período de calcinado genera átomos libres, los cuales permanecen en el paso óptico por un período de tiempo mayor que en el caso de la generación mediante llama.

Vapor frío - Este sistema es extremadamente sensible para determinar mercurio y ciertos elementos formadores de hidruros metálicos estables, tales como arsénico, selenio, antimonio, bismuto, telurio y estaño. Estos pueden ser determinados reduciendo químicamente el elemento y luego arrastrando el producto con un gas inerte hasta la celda de absorción, donde se lo disocia por calentamiento, colocando los átomos así generados en el paso óptico.

Emisión atómica

Los átomos en el estado excitado generalmente son inestables y vuelven rápidamente al estado basal, perdiendo la energía adquirida en el proceso de absorción, dando lugar así a líneas de emisión a la misma longitud de onda a la cual ocurrió la absorción.

Aparato - Consta esencialmente de los mismos componentes que el aparato empleado para absorción atómica, excepto que no requiere una fuente de radiación. La excitación se efectúa empleando llamas de aire-acetileno y óxido nitroso-acetileno, como las indicadas en *Llama*.

La espectrofotometría de emisión atómica acoplada a plasma inductivo (ICP-AES) es una metodología relacionada, donde mediante temperaturas muy elevadas se logra la completa ionización de los elementos, minimizando las interferencias químicas.

Procedimiento general

Para operar el espectrofotómetro deben seguirse las instrucciones del fabricante y realizar el ensayo a la longitud de onda especificada en la monografía correspondiente. Emplear el *Método I* a menos que se especifique de algún modo en la monografía correspondiente.

El espectrofotómetro debe calibrarse según se indica a continuación:

Para las medidas de absorción - Introducir agua o la solución blanco especificada en la monografía correspondiente en el generador de vapor atómico y ajustar la lectura de forma que indique el 100 % de transmitancia. Introducir la solución estándar más concentrada en el generador y ajustar la sensibilidad para obtener una lectura apropiada.

Para las medidas de emisión - Introducir agua o la solución blanco especificada en la monografía correspondiente en el generador de vapor atómico y ajustar la lectura del aparato a cero. Introducir la solución estándar más concentrada en el generador y ajustar la sensibilidad para obtener una lectura apropiada.

Método I
Calibración directa

Preparar no menos de tres soluciones estándar que contengan el elemento a determinar, abarcando el intervalo de concentración recomendado por el fabricante del aparato y para el elemento. Todo reactivo empleado en la preparación de la solución muestra se debe agregar a las soluciones estándar en la misma concentración. Luego de calibrar el aparato, introducir cada solución estándar en el generador por lo menos tres veces y registrar la lectura en cada caso cuando ésta sea constante. [NOTA: si el generador es una llama, lavar con agua o solución blanco luego de cada introducción; si se emplea un horno, quemar luego de cada introducción.] Realizar una curva de calibración, representando el promedio de cada grupo de tres lecturas en función de la concentración. Preparar una solución muestra según se especifica en la monografía correspondiente, ajustando la concentración para que la lectura obtenida esté comprendida dentro del intervalo de concentraciones de las soluciones estándar. Introducir la solución muestra en el generador y registrar la lectura. Repetir este procedimiento dos veces más y, empleando el promedio de las tres lecturas, determinar la concentración del elemento a partir de la curva de calibración.

Método II
Adición de estándar

Transferir volúmenes iguales de la solución muestra preparada según se especifica en la monografía correspondiente a tres matraces aforados. Agregar a dos de ellos una cantidad conocida de la solución estándar especificada para producir una serie de soluciones con cantidades crecientes del elemento a determinar. Diluir el contenido de cada matraz al volumen requerido con agua o el solvente especificado en la monografía correspondiente y homogeneizar. Las concentraciones de las muestras deben estar incluidas en la región donde la respuesta del aparato es directamente proporcional a la concentración.

Luego de calibrar el aparato como se indicó anteriormente, introducir cada solución en el generador no menos de tres veces y registrar la lectura cuando se estabilice. [NOTA: si el generador es una llama, lavar con agua o la solución blanco luego de cada introducción; si se emplea un horno, quemar luego de cada introducción, tomando la precaución de asegurar que la lectura vuelva al valor inicial del blanco luego de cada determinación.] Representar gráficamente los promedios de las lecturas obtenidas en función de la cantidad de elemento agregada, trazando la línea recta que mejor se ajuste a los puntos marcados. Extrapolar la recta hasta su intersección con el eje de las abcisas; la distancia entre este punto y el punto de intersección de los ejes representa la concentración del elemento en la solución muestra.

450. ESPECTROFOTOMETRIA DE FLUORESCENCIA

La espectrofotometría de fluorescencia es una técnica empleada para determinar la concentración de una sustancia comparando la intensidad de luz fluorescente emitida por la misma con la emitida por la *Sustancia de referencia* correspondiente, en las mismas condiciones.

Aparato - Se pueden emplear dos tipos de aparatos, fluorómetro de filtro y espectro-fluorómetro. El primero consta de los siguientes componentes:

— Una fuente de radiación, generalmente una lámpara de mercurio o tungsteno.

— Un filtro primario colocado entre la fuente de radiación y la celda, para seleccionar la longitud de onda de excitación.

— Una celda para contener la muestra.

— Un filtro secundario colocado entre la celda y el detector, que actúa como un filtro interruptor fino que permite transmitir la radiación fluorescente, bloqueando en cambio la radiación dispersa.

— Un detector de fluorescencia colocado de manera que forme un ángulo de 90 ° con respecto a la dirección del haz de luz incidente, con el objeto de minimizar la interferencia de la luz transmitida.

El espectrofluorómetro presenta los mismos componentes que el fluorómetro de filtro, sólo que los filtros se han reemplazado por sistemas monocromadores como prismas o r edes de difracción, siendo frecuentemente empleada una lámpara de arco de xenón a alta presión como fuente de radiación.

Procedimiento - Ajustar la lectura del aparato a cero empleando el solvente o mezcla de solventes indicados para disolver la muestra, a la longitud de onda especificada en la monografía correspondiente. Transferir a la celda un volumen apropiado de una solución estándar preparada a partir de la *Sustancia de referencia* correspondiente y regular la sensibilidad del aparato de modo que la lectura sea mayor a 50. Si el segundo ajuste se realiza modificando la apertura de las rendijas, ajustar nuevamente a cer o el aparato y medir nuevamente la intensidad de fluorescencia de la solución estándar. Disolver la muestra en el solvente o mezcla de solventes especificados en la monografía correspondiente. Transferir un volumen apropiado de esta solución a la celda y medir la intensidad de la luz emitida en las mismas condiciones. Calcular la concentración de la sustancia en la solución muestra, por la fórmula siguiente:

$$c_E I_M / I_E$$

en la cual C_E es la concentración de la solución estándar, I_M es la intensidad de luz emitida por la solución muestra e I_E es la intensidad de luz emitida por la solución estándar.

Realizar el ensayo dentro del intervalo de concentraciones en el cual la respuesta es lineal.

460. ESPECTROFOTOMETRIA INFRARROJA

INFRARROJO MEDIO

Aparato - Los espectrofotómetros para registrar espectros en la región infrarroja están constituidos por un sistema óptico capaz de proveer luz monocromática en la región de 4.000 a 600 cm^{-1} (2,5 a 15 µm), o en algunos casos por debajo de 200 cm^{-1} (50 µm), y por elementos que permiten medir el cociente entre las intensidades de luz transmitida e incidente.

Calibración del aparato - Los aparatos empleados para registrar los espectros infrarrojos especificados en esta Farmacopea deben cumplir con los siguientes ensayos de calibración:

Resolución - Registrar el espectro de una película de poliestireno de 0,05 mm de espesor. La distancia entre el máximo de absorción a 2.851 cm^{-1} (3,51 µm) y el mínimo a 2.870 cm^{-1} (3,48 µm) debe ser equivalente a no menos de 18 % de transmitancia y la distancia entre el máximo a 1.583 cm^{-1} (6,32 µm) y el mínimo a 1 .589 cm^{-1} (6,29 µm) debe ser equivalente a no menos de 12 % de transmitancia.

Verificación de la escala de longitud de onda - La escala de longitud de onda puede verificarse empleando una película de poliestireno que presente máximos de absorción a los siguientes números de onda (en cm^{-1}):

3.027,1 (±0,3)	1.583,1 (±0,3)
2.924,0 (±2,0)	1.181,4 (±0,3)
2.850,7 (±0,3)	1.154,3 (±0,3)
1.9 44,0 (±1,0)	1.069, 1 (±0,3)
1.871,0 (±0,3)	1.028,0 (±0,3)
1.801,6 (±0,3)	906,7 (±0,3)
1.601,4 (±0,3)	698,9 (±0,5)

[NOTA: los valores entre paréntesis indican las tolerancias permitidas.]

Preparación de la muestra - Las muestras se preparan de acuerdo con su naturaleza, de la siguiente manera:

En película fina - Colocar 1 ó 2 gotas entre dos placas de cloruro de sodio u otro material transparente a l a radiación Infrarroja y presionar suavemente las placas para formar una fina película. También puede emplearse una celda del mismo material y de paso óptico apropiado.

En solución - Preparar una solución en el solvente y a la concentración especificada en la monografía correspondiente y transferir a una celda de material transparente a l a radiación infrarroja. La absorción debido al solvente puede compensarse colocando el solvente puro en la celda de referencia; sin embargo, aquellas regiones del espectro en las que el solvente presenta una fuerte absorción no deben tenerse en cuenta. La concentración apropiada del soluto varía según la sustancia, pero en general se emplean concentraciones entre 1 y 10 % para un paso óptico de 0,5 a 0,1 mm.

En fase sólida - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, triturar en un mortero aproximadamente 1 a 2 mg de la sustancia a a nalizar con 200 a 300 mg de bromuro de potasio o c loruro de potasio seco y finamente pulverizado. Estas cantidades son en general apropiadas para un disco de 13 mm de diámetro y un espectro de intensidad apropiada. Moler la mezcla con cuidado, esparcir uniformemente en un molde apropiado y comprimir a una presión de aproximadamente 10.000 kg/cm^2, aplicando vacío. El disco obtenido se coloca en el espectrofotómetro con un s oporte apropiado. Varios factores, tales como una molienda inadecuada, humedad e impurezas en el haluro pueden dar origen a discos no aptos para el análisis. El disco debe desecharse si no es uniforme cuando se lo examina visualmente o si la transmitancia a 2.000 cm^{-1} en ausencia de una banda de absorción específica, es menor de 75 % sin emplear compensación en el haz de referencia.

En suspensión - Triturar 5 a 10 mg de la sustancia a a nalizar con 2 gotas de vaselina líquida apropiada hasta obtener una mezcla cremosa homogénea. Colocar una porción de la mezcla así obtenida entre dos placas de cloruro de sodio u otro material transparente a l a radiación infrarroja y presionar suavemente las placas para formar una película fina.

Gases - Emplear una celda para gases con un paso óptico de aproximadamente 100 mm. Evacuarla y llenarla a l a presión deseada mediante un robinete o válvula de aguja empleando una línea de transferencia apropiada para gases entre la celda y el recipiente de la sustancia a analizar. Si fuera necesario, ajustar la presión con un gas transparente a la radiación infrarroja, como por ej. nitrógeno o argón. Para evitar interferencias de absorción debido al vapor de agua, dióxido de carbono u otros gases atomosféricos, colocar en el haz de referencia una celda idéntica evacuada o llenada con un gas transparente a la radiación infrarroja.

Reflectancia múltiple - Cuando se especifica este método en una monografía, preparar la muestra por uno de los siguientes métodos:

Soluciones - Disolver la muestra en el solvente apropiado bajo las condiciones especificadas en la monografía correspondiente. Evaporar la solución sobre una placa de bromuro de talio-ioduro de talio o sobre otra placa apropiada.

Sólidos - Colocar la muestra sobre una placa de bromuro de talio-ioduro de talio o sobre otra placa apropiada, de manera de lograr un contacto uniforme.

Identificación por medio de espectros de referencia - Preparar la muestra en condiciones similares a las indicadas para la obtención del espectro de referencia y registrar el espectro de la sustancia a analizar. Sobre éste, registrar las bandas de poliestireno a 2.851 cm^{-1} (3,51 µm), 1.601 cm^{-1} (6,25 µm) y 1.028 cm^{-1} (9,73 µm). Comparar los espectros y los máximos del poliestireno indicados en *Verificación de la escala de longitud de onda*. Las zonas correspondientes a la impresión digital (entre 1.400 a 600 cm^{-1}) de ambas sustancias deben ser en un todo concordantes.

Identificación por medio de sustancias de referencia - Preparar la muestra según se especifica en la monografía correspondiente teniendo en cuenta la metodología indicada en *Preparación de la muestra*. Tratar la *Sustancia de referencia* de la misma manera. Registrar los espectros entre 4.000 y 600 cm^{-1} (2,5 a 15 µm) bajo las mismas condiciones. Los máximos de absorción, correspondientes a la zona de impresión digital (entre 1.400 a 600 cm^{-1}), en el espectro obtenido con la muestra deben corresponder en posición e intensidad relativa a los del obtenido con la *Sustancia de referencia*.

470. ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA Y VISIBLE

La espectrofotometría en el ultravioleta y visible consiste en la medida de la absorción de las radiaciones electromagnéticas comprendidas en un intervalo espectral de 200 a 400 nm para la región ultravioleta y de 400 a 700 nm para la región visible.

El grado en que la radiación es absorbida al pasar a través de un medio homogéneo se expresa en términos de absorbancia, *A*. La absorbancia de una solución es el logaritmo decimal de la inversa de la transmitancia, *T*, siendo esta última definida: como la fracción de radicación incidente que logra atravesar la muestra. Para una radiación monocromática, *A* se calcula mediante la siguiente expresión:

$$A = \log(1/T) = \log(I_0 / I)$$

donde I_o es la intensidad de radiación incidente e *I* es la intensidad de radiación transmitida.

De acuerdo con la ley de Lambert-Beer, la absorbancia es proporcional al paso óptico, *d*, de la capa absorbente atravesada por la radiación y a la concentración, *c*, del analito:

$$A = kdc$$

La constante de proporcionalidad, *k*, asume distintas denominaciones según las unidades en que *d* y *c* son expresadas:

Absortividad (*a*): es la absorbancia de una solución cuya concentración, *c*, es de 1 g por litro, medida en una celda de paso óptico, *d*, de 1 cm.

$$a = A / cd$$

Coeficiente de extinción específica [*E*(1 %, 1 cm)]: es la absorbancia de una solución cuya concentración, c, es de 1 %, medida en una celda de paso óptico, *d*, de 1 cm,

$$E(1\%,1cm) = A / cd = 10a$$

Absortividad molar ($\in$): es la absorbancia de una solución cuya concentración es 1 mol por litro, medida en una celda de paso óptico, *d*, de 1 cm. Puede calcularse como el producto de la absortividad por el peso molecular, *PM*, del analito.

$$\in = aPM$$

Los valores de *a*, *E* (1 %, 1 cm) y $\in$, a una longitud de onda específica y en un solvente determinado son característicos del analito.

Aparato - Consta de un sistema óptico capaz de producir luz monocromática en la región de 200 a 800 nm, un dispositivo para seleccionar una banda angosta de longitudes de onda, una celda para contener la muestra y un detector apropiado para determinar la absorbancia.

Cuando se emplean aparatos de doble haz, la celda que contiene el blanco se coloca en el haz de referencia. Las celdas empleadas para la solución muestra y el blanco deben tener las mismas características espectrales.

Calibración del aparato - Los aparatos empleados para registrar los espectros ultravioleta y visible indicados en esta Farmacopea deben cumplir con los siguientes ensayos:

Verificación de la escala de longitud de onda - La escala de longitud de onda puede verificarse midiendo los máximos de absorbancia de una solución estándar de perclorato de holmio a 241,15; 287,15; 361,50 y 536,30 nm, los máximos de absorbancia correspondientes a las líneas de emisión de una lámpara de hidrógeno a 486,10 nm o deuterio a 486,00 nm, o las líneas de un arco de vapor de mercurio a 253,70; 302,25; 313,16; 334,15; 365,48; 404,66; 435,83; 546,07; 576,96 y 579,07 nm. La tolerancia permitida es de ± 1 nm para el ultravioleta y ± 3 nm para el visible.

Control de absorbancias - Controlar la absorbancia con una solución de dicromato de potasio preparada según se indica a continuación:

Solución de dicromato de potasio - Transferir a un matraz aforado de 1 litro aproximadamente 60 mg de dicromato de potasio, exactamente pesados y previamente secados a 130 ºC hasta peso constante. Disolver y diluir a volumen con ácido sulfúrico 0,005 M.

Registrar el espectro de la *Solución de dicromato de potasio* y determinar las absorbancias a las longitudes de onda especificadas en la *Tabla*. Los valores de *E* (1 %, 1 cm) deben estar dentro de las tolerancia especificadas.

Tabla.

Longitud de onda (nm)	*E* (1 %, 1 cm)	Tolerancia máxima
235	124,5	122,9 a 126,2
257	144,0	142,4 a 145,7
313	48,6	47,0 a 50,3
350	106,6	104,9 a 108,2

Límite de luz espuria - La absorbancia de una solución de cloruro de potasio al 1,2 %, medida a 200 nm con un paso óptico de 1 cm, empleando agua como blanco, debe ser mayor de 2.

Resolución (para análisis cualitativo) - Registrar el espectro de una solución de tolueno al 0,02 % en hexano. La relación entre el máximo de absorbancia a 269 nm, y el mínimo a 266 nm no debe ser menor de 1,5.

Asimismo, deberán tenerse las siguientes precauciones:

Ancho de rendija (para análisis cuantitativo) - Cuando se mide la absorbancia a un máximo de absorción y cuando se emplea un aparato con ancho de rendija variable a la longitud de onda seleccionada, el ancho de rendija debe ser pequeño comparado con la mitad del ancho de la banda de absorción. Sin embargo, debe ser lo más grande posible para obtener un valor alto de I_o y debe ser tal que una reducción adicional no resulte en un aumento de la lectura de absorbancia.

Celdas - Las absorbancias de las celdas de lectura, cuando se llenan con el mismo solvente, deben ser iguales. Si este no es el caso, debe aplicarse una corrección apropiada.

La tolerancia en el paso óptico de las celdas empleadas es ± 0,005 cm. Las celdas deben limpiarse y manipularse con cuidado.

Solventes - Cuando se mide la absorbancia de una solución a una longitud de onda determinada, la absorbancia de la celda de referencia y su contenido no debe ser mayor de 0,4 y es conveniente que sea menor de 0,2 cuando se mide en referencia al aire a la misma longitud de onda. El solvente en la celda de referencia debe ser del mismo lote que el empleado para preparar la solución muestra.

Determinación de la absorbancia - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, medir la absorbancia a la longitud de onda especificada empleando celdas de 1 cm de paso óptico y efectuar las medidas con referencia al solvente o solventes empleados para preparar la solución muestra. En caso de que las medidas se deban efectuar con referencia a una mezcla de reactivos, los detalles se describen en las monografías correspondientes.

Cuando en una monografía se especifica la longitud de onda a la cual se presenta un máximo de absorción, implica que dicho máximo presenta una tolerancia de ± 2 nm.

Cuando un ensayo indica el empleo de una *Sustancia de referencia*, se deben realizar las medidas espectrofotométricas con la solución preparada a partir de la *Sustancia de referencia* y luego con la solución correspondiente preparada a partir de la muestra. Efectuar las medidas en sucesión inmediata, empleando la misma celda y las mismas condiciones experimentales.

Identificación por medio de Sustancias de referencia - Cuando en una monografía se especifica un ensayo de identificación por espectrofometría ultravioleta, la solución muestra y la solución estándar deben medirse en celdas de 1 cm de paso óptico, en el intervalo espectral comprendido entre 200 y 400 mm, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Disolver una porción de la muestra en el *Solvente* especificado para obtener una solución con una concentración conocida aproximadamente igual a la especificada en *Concentración* en la monografía correspondiente. En forma similar, preparar una *Solución estándar* que contenga la *Sustancia de referencia* correspondiente.

Registrar en sucesión inmediata los espectros de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*. Calcular los coeficientes de extinción específica y/o la relación de absorbancias según se especifica en la monografía correspondiente. Los requisitos se cumplen si los espectros de absorción ultravioleta de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* presentan máximos y mínimos a las mismas longitudes de onda, y los coeficientes de extinción específica y/o la relación de absorbancias están dentro de los límites especificados en dicha monografía

475. ESTERILIZACIÓN

Ver *475. Esterilización* en *Apartado de Productos Médicos* en *Volumen III.*

480. GRASAS Y ACEITES FIJOS

Ver *480. Grasas y aceites fijos* en *Apartado de Fitoterápicos* en *Volumen III.*

490. IDENTIFICACIÓN DE BASES ORGÁNICAS NITROGENADAS

El siguiente ensayo se emplea para identificar sustancias que posean grupos amino terciarios.

Solución muestra - Para realizar el ensayo sobre materia prima, disolver 50 mg de la sustancia en ensayo en 25 ml de ácido clorhídrico 0,01 N. Para realizar el ensayo sobre comprimidos, reducirlos a polvo fino y disolver con agitación una cantidad, equivalente a 50 mg de la sustancia en ensayo, con 25 ml de ácido clorhídrico 0,01 N. Si el producto se presenta en cápsulas, proceder del mismo modo con una cantidad de polvo extraída de las mismas. Transferir la solución obtenida a u na ampolla de decantación, filtrar y lavar con agua el residuo y el filtro, si fuera necesario.

Solución estándar - Transferir 50 mg de la *Sustancia de referencia* correspondiente a una ampolla de decantación y disolver en 25 ml de ácido clorhídrico 0,01 N.

Procedimiento - Para cada solución, proceder de la siguiente manera: agregar 2 ml de hidróxido de sodio 1 N y 4 ml de disulfuro de carbono. Agitar durante 2 minutos y, si fuera necesario, centrifugar la solución para clarificar la fase inferior. Filtrar a través de un filtro seco, recolectando el filtrado en un matraz apropiado con tapón de vidrio.

Determinar el espectro de absorción infrarroja de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, en celdas de 1 mm, a una longitud de onda entre 7 y 15 μm, con un espectrofotómetro apropiado, empleando disulfuro de carbono como blanco. El espectro de absorción infrarroja de la *Solución muestra* debe presentar las mismas bandas de absorción que el de la *Solución estándar*

500. IDENTIFICACION DE TETRACICLINAS

El siguiente ensayo se emplea para identificar sustancias pertenecientes al grupo de las tetraciclinas. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, emplear el *Método I.*

Solución estándar - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, disolver y diluir la *Sustancia de referencia* correspondiente a l a sustancia a identificar con el mismo solvente especificado para la *Solución muestra*, para obtener una solución con una concentración similar a l a obtenida para la *Solución muestra.*

Solución muestra - Proceder según se especifica en la monografía correspondiente.

Método I

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromatografía*) recubierta con gel de sílice octilsilanizado con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor. Activar la placa por calentamiento a 130 °C durante 20 minutos, dejar enfriar y emplearla mientras esté tibia.

Fase móvil - Acido oxálico 0,5 M, previamente ajustado a pH 2,0 con hidróxido de amonio, acetonitrilo y metanol (80:20:20).

Solución de resolución - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, preparar una solución en metanol que contenga 0,5 mg de Clorhidrato de Clortetraciclina SR-FA, Hiclato de Doxiciclina SR-FA, Oxitetraciclina SR-FA y Clorhidrato de Tetraciclina SR-FA por ml.

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa 1 µl de la *Solución estándar*, *Solución muestra* y *Solución de resolución*. Dejar secar las aplicaciones y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartos de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejarla secar al aire. Exponer la placa a vapores de amoníaco durante 5 minutos e inmediatamente examinar bajo luz ultravioleta a 366 mm: el cromatograma de la *Solución de resolución* debe presentar manchas separadas y la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* debe ser similar en intensidad, apariencia y valor de R_f a la obtenida a partir de la *Solución estándar.*

Método II

Solución reguladora de pH 3,5 - Disolver 13,4 g de ácido cítrico anhidro y 16,3 g de fósfato dibásico de sodio en 1 litro de agua y mezclar.

Fase estacionaria - Emplear un papel para cromatografía de 20 cm x 20 cm (Whatman N° 1 o equivalente). Impregnar la hoja con *Solución reguladora de pH 3,5* y eliminar el exceso del solvente presionando firmemente la hoja entre dos papeles secantes no fluorescentes.

Fase móvil - Nitrometano, cloroformo y piridina (20:10:3). Emplear esta mezcla el mismo día de preparada.

Solución mezcla - *Solución estándar* y *Solución muestra* (50:50).

Procedimiento - En una cámara para cromatografía ascendente (ver *100. Cromatografía*), colocar la *Fase móvil* hasta una altura de 0,6 cm. Sobre la línea de siembra en la hoja de papel y con una separación de 1,5 cm, aplicar 2 µl de la *Solución estándar*, *Solución muestra* y *Solución mezcla*. Antes de que las aplicaciones se sequen completamente, colocar el papel en la cámara cromatográfica de manera que el borde inferior se introduzca en la *Fase móvil*. Desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente 10 cm, retirar la hoja de la cámara, marcar el frente del solvente y exponerla a vapores de amoníaco. Examinar bajo luz ultravioleta a 366 nm y visualizar la posición de las manchas amarillas principales: el valor del *Rf* de la mancha principal obtenida a partir de la *Solución muestra* y la *Solución mezcla* debe ser similar al obtenido a partir de la *Solución estándar*.

510. IMPUREZAS COMUNES

El perfil de impurezas de un producto se determina mediante la realización de este ensayo. La información general necesaria sobre cromatografía en placa delgada esta contenida en <*100*>. *Cromatografía*. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente emplear el siguiente ensayo.

Fase estacionaria - Emplear una placa para cromatografía en capa delgada (ver *100. Cromalografía*) recubierta con gel de sílice para cromatografía con indicador de fluorescencia de 0,25 mm de espesor.

Fase móvil - Emplear la fase móvil especificada en la monografía correspondiente.

Soluciones estándar - Preparar, empleando el solvente especificado en la monografía correspondiente, soluciones de la *Sustancia de referencia* o de la sustancia indicada, de concentraciones exactamente conocidas, iguales a 0,01; 0,05; 0,1 y 0,2 mg por ml. [NOTA: puede emplearse calentamiento o sonicación para favorecer la disolución cuando esto no afecte a la *Sustancia de referencia*.]

Solución muestra - Preparar, empleando el solvente especificado en la monografía correspondiente, una solución que contenga una concentración final de aproximadamente 10 mg por ml. [NOTA: se puede emplear calentamiento o sonicación para favorecer la disolución cuando esto no afecte a los componentes de la muestra.]

Procedimiento - Aplicar por separado sobre la placa volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución muestra* y las *Soluciones estándar*. Secar las aplicaciones bajo una corriente de nitrógeno y desarrollar los cromatogramas hasta que el frente del solvente haya recorrido aproximadamente tres cuartos de la longitud de la placa. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar secar al aire. Examinar la placa empleando el *Revelador* especificado. Localizar las manchas, con excepción de la mancha principal en el cromatograma de la *Solución muestra*, y determinar sus intensidades relativas comparando con los cromatogramas de las *Soluciones estándar* correspondientes. El total de impurezas comunes no debe ser mayor de 2,0 %, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Reveladores -

1. Luz ultravioleta de 254 y 366 nm.
2. Iodoplatinato (SR).
3. Solución A - Mezclar 850 mg de subnitrato de bismutocon 40 ml de agua y 10 ml de ácido acético glacial.

Solución B - Disolver 8 g de ioduro de potasio en 20 ml de agua.

Mezclar la Solución A y la Solución B para obtener una solución que pueda ser almacenada durante varios meses en envases de vidrio inactínico. M ezclar 10 ml de esta solución con 20 ml de ácido acétco glacial y diluir con agua para obtener 100 ml.

4. Solución de ninhidrina para pulverizado - Disolver 200 mg de ninhidrina en 100 ml de alcohol. Calentar la placa luego de pulverizar sobre ésta.
5. Solución ácida para pulverizado - A 90 ml de alcohol, en un baño de hielo, agregar lentamente y con cuidado, agitando constantemente, 10 ml de ácido sulfúrico. Pulverizar sobre la placa y calentar hasta carbonizar.
6. Solución de dicromato ácido para pulverizado - A 100 ml de ácido sulfúrico, agregar dicromato de potasio, en cantidad suficiente, para obtener una solución saturada. Pulverizar sobre la placa y calentar hasta carbonizar.
7. Vainillina - Disolver 1 g de vainillina en 100 ml de ácido sulfúrico.
8. Cloramina T-Acido tricloroacético - Mezclar 10 ml de una solución acuosa de cloramina T al 3 % con 40 ml de una solución alcohólica de ácido tricloroacético al 25 %. Preparar inmediatamente antes de usar.
9. Folin C - A 70 ml de agua agregar 10 g de tungstato de sodio y 2,5 g de molibdato de sodio. Agregar 5 ml de ácido fosfórico al 85 % y 1 0 ml de ácido clorhídrico al 36 %, calentar a r eflujo esta solución durante 10 horas.
10. Permanganato de potasio ($KMnO_4$) - Disolver 100 mg de permanganato de potasio en 100 ml de agua.
11. DAB - Mezclar 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 100 ml de ácido clorhídrico 0,6 N.
12. DAC - Mezclar 100 mg de p-dimetilaminocinamaldehído en 100 ml de ácido clorhídrico 1 N.
13. Ferricianuro - Mezclar cloruro férrico al 1 % y ferricianuro de potasio al 1 % (50:50). Emplear inmediatamente.
14. Fast Blue B -

Reactivo A - Disolver 500 mg de Sal de Fast Blue B en 100 ml de agua.

Reactivo B - Hidróxido de sodio 0,1 N. Pulverizar sobre la placa primero con activo A y luego con reactivo B.

15. Cianuro férrico alcalino - Diluir 1,5 ml de una solución de ferricianuro de potasio al 1% con agua a 2 0 ml y agregar 10 ml de solución de hidróxido de sodio al 15 %.

16. Solución de iodo para pulverizado - Preparar una solución de iodo al 0,5 % en cloroformo.

17. Exponer la placa durante 10 minutos a vapores de iodo en una cámara cerrada que en el fondo contiene cristales de iodo.

Solución A - Disolver 0,5 g de ioduro de potasio en 50 ml de agua.

Solución B - Preparar una solución de 0,5 g de almidón soluble en 50 ml de agua caliente. Pulverizar sobre la placa con una mezcla de volúmenes iguales de Solución A y Solución B.

19. PTS - Disolver 20 g de ácido p-toluensulfónico en 100 ml de alcohol. Pulverizar sobre la placa, secar durante 15 minutos a 110 °C y examinar bajo luz ultravioleta a 366 nm.

20. Solución de o-toluidina para pulverizado - Disolver 160 mg de o-toluidina en 30 ml de ácido acético glacial, diluir con agua a 500 ml. Agregar 1 g de ioduro de potasio y mezclar hasta disolución completa.

21. Mezclar 3 ml de solución de ácido cloroplatínico (1 en 10) con 97 ml de agua. Agregar 100 ml de solución de ioduro de potasio (6 en 100).

22. Solución de iodo-metanol para pulverizado - Mezclar yodo (SR) y metanol (1:1).

23. Solución A: mezclar cuidadosamente 100 ml de solución de oxido de mercurio al 5 % con 20 ml de ácido sulfúrico. Diluir a 250 ml con agua.

Solución B: solución de difenil carbazona al 0,1 %. Esta solución se debe preparar en el día de su uso o debe ser mantenida bajo refrigeración por no más de 20 días. Pulverizar en forma sucesiva, sobre la placa, primero con Solución A y luego con Solución B.

520. IMPUREZAS ORGÁNICAS VOLÁTILES

Los siguientes métodos se emplean para la determinación de impurezas orgánicas volátiles en productos farmacéuticos. El método a emplear, los detalles y variaciones del mismo se especifican en las monografías correspondientes.

Este ensayo puede evitarse cuando el elaborador tiene la seguridad, en base a su conocimiento sobre el proceso de elaboración, distribución y almacenamiento de un producto, que no hay presencia potencial de solventes tóxicos y que el material, si se ensaya, cumplirá con las normas establecidas (ver *Interpretación de los requisitos* en *Consideraciones generales*).

[NOTA: el agua libre de sustancias orgánicas especificada en los siguientes métodos no produce picos interferentes cuando se inyecta en el *Sistema cromatográfico establecido*.]

ÓXIDO DE ETILENO - Este ensayo se realiza sólo cuando se especifica en la monografía correspondiente. Los parámetros de la *Solución estándar* y el método de determinación se describen en la monografía correspondiente. El límite es 10 ppm.

Método I

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama, una precolumna de 5 m x 0,53 mm de sílice desactivada con fenilmetilsiloxano y una columna de 30 m x 0,53 mm de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria, químicamente unida, constituida por 5 % de fenilpolisiloxano y 95 % de metilpolisiloxano de 5 µm. Mantener el inyector y el detector a aproximadamente 70 y 260 °C, respectivamente. Programar la temperatura de la columna del siguiente modo: mantener a 35 °C durante 5 minutos, aumentar hasta 175 °C a razón de 8 °C por minuto y luego aumentar hasta 260 °C a razón de 35 °C por minuto. Mantener a esta temperatura, por lo menos, durante 16 minutos. Se emplea helio como gas transportador con una velocidad lineal de aproximadamente 35 cm por segundo. [NOTA: se recomienda nitrógeno, cuando se emplea un gas de compensación adicional para aumentar el caudal en el detector.]

Solución estándar - Preparar una solución, en agua libre de sustancias orgánicas o en el solvente especificado en la monografía correspondiente, que contenga, por cada ml, 12,0 µg de cloruro de metileno; 1,2 µg de cloroformo; 7,6 µg de 1,4-dioxano y 1,6 µg de tricloroetileno. [NOTA: la solución se debe preparar en el día de uso.]

Solución muestra - Disolver una porción de la muestra, exactamente pesada, en agua libre de sustancias orgánicas o en el solvente especificado en la monografía correspondiente, para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 20 mg por ml.

Aptitud del sistema - (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, *R,* no debe ser menor de 1,0 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es mayor de 15 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Identificar todos los picos presentes en los cromatogramas de la *Solución muestra*. La presencia e identidad de cualquiera de las impurezas volátiles enumeradas en la *Tabla* o la presencia e identidad de cualquier otra impureza orgánica volátil que eluya con un tiempo de retención comparable, se podrá establecer empleando un detector de espectrometría de masa o mediante el empleo de una segunda columna validada que contenga una fase estacionaria diferente.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, la cantidad de cada impureza orgánica volátil presente en el material no debe ser mayor al límite especificado en la *Tabla*.

Tabla.

Límite de impurezas orgánicas volátiles	
	Límite (ppm)
Benceno	2
Cloroformo	60
1,4-Dioxano	380
Cloruro de metileno	600
Tricloroetileno	80

Método II

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama, una precolumna de sílice de 5 m x 0,53 mm desactivada con fenilmetilsiloxano y una columna de sílice fundida de 30 m x 0,53 mm recubierta con una fase estacionaria constituida por 94 % de dimetilpolisiloxano y 6 % de cianopropilfenil polisiloxano (los porcentajes se refieren a la sustitución molar), de 3,0 µm de espesor, empleando una jeringa hermética para gases previamente calentada y 1 ml del espacio libre superior. Mantener el inyector y el detector a aproximadamente 140 y 260 °C, respectivamente. Programar la temperatura de la columna del siguiente modo: mantener a 40 °C durante 20 minutos, aumentar rápidamente hasta 240 °C y mantener a esta temperatura durante 20 minutos. Se emplea helio como gas transportador con una velocidad lineal de aproximadamente 35 cm por segundo.

[NOTA: pueden emplearse aparatos de muestreo de espacio libre superior que transfieren automáticamente una cantidad medida del espacio libre superior del vial a la columna.]

Solución estándar - Preparar según se indica para la *Solución estándar* en *Método I*. Transferir 5 ml de la solución a un vial equipado con un septo y precinto metálico que contenga 1 g de sulfato de sodio anhidro y sellar el vial. Calentar el vial a 80 °C durante 60 minutos.

Solución muestra - Transferir 100 mg de muestra, exactamente pesados, a un vial. Agregar 5,0 ml de agua o el solvente especificado en la monografía correspondiente y 1 g de sulfato de sodio anhidro. Tapar con un septo y precintar. Calentar el vial a 80 °C durante 60 minutos o el tiempo especificado en la monografía correspondiente.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Método I.*

Método III

Sistema cromatográfico y *Procedimiento* - Proceder según se indica en *Método II*, pero sin emplear una jeringa hermética para gases previamente calentada y 1 ml del espacio libre superior.

Solución estándar y *Solución muestra* - Proceder según se indica en *Método I.*

Aptitud del sistema - (ver *100. Cromatografía*) - Cromatografiar la *Solución estándar*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, *R*, no debe ser menor de 3 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no debe ser mayor de 15 %.

Método IV

Emplear este método para determinar la presencia de cloruro de metileno en comprimidos recubiertos. El límite de cloruro de metileno es 500 µg por día, en base a la dosis diaria máxima declarada en el rótulo.

Sistema cromatográfico - Proceder según se indica en *Método III*, pero inyectar 1 ml de muestra del espacio libre superior, empleando una jeringa hermética para gases previamente calentada. [NOTA: puede emplearse un aparato de muestreo de espacio libre superior que automáticamente transfiere una cantidad medida de muestra del espacio libre superior del vial a la columna.]

Solución madre del estándar - Transferir 3,8 µl, exactamente medidos, equivalentes a 5 mg de cloruro de metileno a un matraz aforado de 1 litro, diluir a volumen con agua libre de sustancias orgánicas y mezclar.

Solución estándar - [NOTA: realizar una incisión en la cubierta de los comprimidos antes de preparar la solución.] Transferir varios comprimidos enteros, equivalente a 1 g, a un matraz aforado con tapón de vidrio. Transferir 20 ml de *Solución madre del estándar* al matraz, insertar el tapón con firmeza, colocar en un baño ultrasónico hasta que los comprimidos se desintegren completamente y centrifugar la

solución resultante. Transferir 2 ml de la solución sobrenadante transparente a un-vial equipado con un septo y una tapa con precinto metálico y sellar. Colocar el vial en un baño de agua a 85 °C durante aproximadamente 20 minutos.

Solución muestra - Preparar según se indica para la *Solución estándar*, pero empleando 20 ml de agua libre de sustancias orgánicas en vez de 20 ml de *Solución madre del estándar*.

Solución de aptitud del sistema - Preparar una solución en agua libre de sustancias orgánicas que contenga, por ml, 5 µg de alcohol y 5 µg de cloruro de metileno. Transferir 2,0 ml a un vial equipado con un septo y una tapa, con precinto metálico y sellar. Colocar el vial en un baño de agua a 85 °C durante 20 minutos.

Aptitud del sistema (ver *100. Cromatografía*) Cromatografiar 1 ml de la fase gaseosa de la *Solución de aptitud del sistema*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos según se indica en *Procedimiento*: la resolución, *R,* entre el alcohol y el cloruro de metileno no es menor de 1,5 y la desviación estándar relativa para inyecciones repetidas no es mayor de 10,0 %.

Procedimiento - Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 1 ml) del espacio libre superior de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*. Registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. Determinar la presencia de cloruro de metileno en la *Solución muestra*. Calcular la cantidad de cloruro de metileno, en µg por comprimido.

Calcular la cantidad máxima permitida de cloruro de metileno, en µg por comprimido por día, por la fórmula siguiente:

$$\frac{500(\mu g/día)}{D(mg)} \times C\,(mg/comprimido)$$

en la cual *D* representa la dosis máxima diaria y *C* la cantidad declarada de principio activo por comprimido.

La cantidad de cloruro de metileno por comprimido no debe ser mayor que la cantidad máxima permitida calculada por la fórmula.

530. LIBERACION DE PRINCIPIOS ACTIVOS

En el presente capítulo se incluyen las metodologías aplicables a productos de liberación prolongada y a productos de liberación retardada (con cubierta entérica). La elección de una u otra dependerá de las características de liberación establecidas para el producto.

PRODUCTOS DE LIBERACION PROLONGADA

Las alícuotas extraídas para efectuar el ensayo serán reemplazadas por volúmenes iguales de *Medio* a 37 °C. Cuando se haya demostrado que el agregado de medio durante el ensayo no es necesario, se podrán aplicar correcciones por el cambio de volumen al realizar los cálculos.

Aparato - Emplear el *Aparato 1* o el *Aparato 2* (ver *320. Ensayo de disolución*) según se especifique en la monografía correspondiente.

Medio y procedimiento - Proceder según se indica para *Muestreo individual* en *<320>. Ensayo de disolución*.

Tiempo - Las alícuotas se deben extraer en por lo menos tres tiempos diferentes, expresados en horas, con una tolerancia de ± 2 % del tiempo establecido.

Interpretación - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos se cumplen si la cantidad disuelta de principio activo se ajusta a la *Tabla de aceptación 1*. En el caso que los resultados no estén dentro de los límites especificados para N_1 se deberá continuar el ensayo para N_2 y N_3. Los límites de principio activo disuelto se expresan en función del porcentaje del contenido declarado.

PRODUCTOS DE LIBERACIÓN RETARDADA (CUBIERTA ENTERICA)

Emplear el *Método I* o *II* y el *Aparato 1* ó *2* según se especifique en la monografía correspondiente.

Método I

Procedimiento -

ETAPA ÁCIDA - Transferir 750 ml de ácido clorhídrico 0,1 N a cada vaso. Dejar que el medio se equilibre a una temperatura de 37,0 ± 0,5 °C. Colocar un comprimido o una cápsula en cada vaso y operar el equipo durante 2 horas a la velocidad especificada en la monografía correspondiente. Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso y proceder de inmediato según se indica en *Etapa de la solución reguladora*. Realizar el análisis de las alícuotas tomadas empleando el *Procedimiento* indicado en la monografía correspondiente.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos de esta etapa se cumplen si la cantidad disuelta de principio activo, calculada como porcentaje del contenido declarado, se ajusta a la *Tabla de aceptación 2*.

ETAPA DE LA SOLUCIÓN REGULADORA - [NOTA: agregar la solución reguladora y ajustar el pH en no más de 5 minutos.] Con el equipo funcionando a la velocidad especificada en la monografía correspondiente, agregar al líquido contenido en cada vaso, 250 ml de fosfato tribásico de sodio 0,20 M equilibrado a 37,0 ± 0,5 °C. Ajustar, si fuera necesario, con ácido clorhídrico 2 N o hidróxido de sodio 2 N a pH 6,80 ± 0,05. Continuar operando el equipo durante un tiempo máximo de 45 minutos o durante el tiempo especificado en la monografía correspondiente. Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso analizándolas empleando el *Procedimiento* indicado en la monografía correspondiente.

Interpretación - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos se cumplen si la cantidad disuelta de principio activo se ajusta a la *Tabla de aceptación 3*. Continuar el ensayo a través de los tres niveles, salvo que los resultados de ambas etapas estén dentro de los límites especificados para un nivel inferior. El valor de *Q* en la *Tabla de aceptación 3* debe ser 75 %, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. El valor de *Q*, especificado en la monografía, es la cantidad total de principio activo disuelto en la *Etapa ácida* y en la *Etapa de la solución reguladora*, expresado como porcentaje del contenido declarado en el rótulo. Los valores de 5 y 15 % en la *Tabla de aceptación 3* son porcentajes del contenido declarado en el rótulo, es decir, estos valores y *Q* están en los mismos términos.

Método II

Procedimiento -

ETAPA ÁCIDA - Transferir 1 litro de ácido clorhídrico 0,1 N a cada vaso. Dejar que el medio se equilibre a una temperatura de 37 ± 0,5 °C. Colocar un comprimido o una cápsula en cada vaso y operar el equipo durante 2 horas a la velocidad especificada en la monografía correspondiente. Cumplido el tiempo

especificado, extraer una alícuota de cada vaso y proceder de inmediato según se indica en *Etapa de la solución reguladora*. Realizar el ensayo de las alícuotas extraídas empleando el *Procedimiento* indicado en la monografía correspondiente.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos de esta etapa se cumplen si la cantidad disuelta de principio activo, calculada como porcentaje contenido declarado en el rótulo, se ajusta a l a *Tabla de aceptación 2*.

ETAPA DE LA SOLUCION REGULADORA -

[NOTA: emplear solución reguladora previamente equilibrada a u na temperatura de 37,0 ± 0,5 °C.] Descartar el medio ácido del vaso y agregar al mismo 1 litro de solución reguladora de fosfato de pH 6,8, preparada mezclando ácido clorhídrico 0,1 N con fosfato tribásico de sodio 0,20 M (3: 1) y ajustando, si fuera necesario, con ácido clorhídrico 2 N o hidróxido de sodio 2 N a pH 6,80 ± 0,05. [NOTA: este procedimiento puede realizarse también del siguiente modo: retirar el vaso que contiene el ácido, sustituirlo por otro vaso que contenga la solución reguladora y transferir la unidad de dosificación al vaso que contiene la solución reguladora.] Continuar operando el equipo durante un tiempo máximo de 45 minutos o durante el tiempo especificado en la monografía correspondiente. Cumplido el tiempo especificado, extraer una alícuota de cada vaso, analizándolas empleando el *Procedimiento* indicado en la monografía correspondiente.

Interpretación - Proceder según se indica para *Interpretación* en el *Método I*.

Tabla de aceptación 1.

Nivel	Unidades ensayadas	Criterios
N_1	6	Ningún valor individual debe encontrarse fuera de los correspondientes intervalos establecidos y ningún valor individual es menor al establecido para el tiempo final.
N_2	6	El promedio de las 12 unidades (N_1+N_2) debe encontrarse dentro de cada uno de los intervalos establecidos y el promedio para el tiempo final no debe ser menor que el valor establecido para dicho tiempo. N ingún valor individual debe ser diferente en más de un 10 %, del contenido declarado, de los intervalos establecidos; y ningún valor individual debe ser menor en más de un 10 %, del contenido declarado, del límite establecido para el tiempo final.
N_3	12	El promedio de las 24 un idades (N_1+N_2+N_3) debe encontrarse dentro de cada uno de los intervalos establecidos y el promedio para el tiempo final no debe ser menor que el valor establecido para dicho tiempo. No más de 2 de los 24 valores individuales podrán ser diferentes en más de un 10 % del contenido declarado de los intervalos establecidos; no más de 2 de los 24 valores individuales podrán ser menores en más de un 10 % del contenido declarado del límite establecido para el tiempo final; y ningún valor individual es diferente en más de un 20 % del contenido declarado por debajo del límite establecido para el tiempo final.

Tabla de aceptación 2.

Nivel	Unidades ensayadas	Criterios
Na_1	6	En ninguna unidad individual la cantidad disuelta debe ser mayor de 10 %.
Na_2	6	El promedio de la cantidad disuelta para las 12 unidades ($Na_1 + Na_2$) no debe ser mayor de 10 % y en ninguna unidad individual la cantidad disuelta debe ser mayores de 25.
Na_3	12	El promedio de la cantidad disuelta para las 24 unidades ($Na_1 + Na_2 + Na_3$) no debe ser mayor de 10 %y en ninguna unidad individual la cantidad la cantidad disuelta debe ser mayor de 25 %.

Tabla de aceptación 3.

Nivel	Unidades ensayadas	Criterios
Nb_1	6	Cada unidad individual no debe ser menor de $Q + 5$ %.
Nb_2	6	El promedio de la cantidad disuelta para las 12 unidades ($Nb_1 + Nb_2$) debe ser igual o mayor que Q y ninguna unidad individual debe ser menor de $Q - 15$ %.
Nb_3	12	El promedio de las 24 unidades ($Nb_1 + Nb_2 + Nb_3$) debe ser igual o mayor que Q, no más de 2 unidades deben ser menores de $Q - 15$ % y ninguna unidad individual debe ser menor de $Q - 25$ %.

540. LIMITE DE ARSENICO

Precaución - La arsina generada es sumamente tóxica.

Este procedimiento se diseñó para determinar la presencia de trazas de arsénico transformándolo en arsina, la cual forma un complejo de color rojo al pasar a través de una solución de dietilditiocarbamato de plata. El color rojo producido se compara, visual o espectrofotométricamente, contra un control que tiene una cantidad de arsénico equivalente al límite especificado en la monografía correspondiente. Los límites se establecen en términos de arsénico. El contenido de arsénico no debe exceder el límite especificado en la monografía correspondiente.

Existen dos métodos que difieren en el tratamiento preliminar de la muestra a ensayar y del estándar. El *Método I* se emplea generalmente para sustancias inorgánicas y el *Método II* para sustancias orgánicas.

Aparato (ver *Figura*) - Consta de un generador de arsina *A*, al que se le adapta una unidad depuradora *C*, y un tubo de absorción *E*, con juntas estándar o esféricas *B* y *D*, colocadas entre las unidades. Se puede emplear cualquier otro aparato que tenga características similares.

Solución madre de trióxido de arsénico - Transferir 132,0 mg de trióxido de arsénico, exactamente pesados y previamente secados a 105 °C durante 1 hora, a un matraz aforado de 1 litro. Agregar 5 ml de solución de hidróxido de sodio (1 en 5) y disolver. Neutralizar la solución con ácido sulfúrico 2 N, agregar 10 ml adicionales de ácido sulfúrico 2 N, completar a volumen y mezclar con agua recientemente hervida y enfriada.

Solución estándar de arsénico - Transferir 10,0 ml de la *Solución madre de trióxido de arsénico* a un matraz aforado de 1 litro y agregar 10 ml de ácido sulfúrico 2 N. Completar a volumen y mezclar con agua recientemente hervida y enfriada. Cada ml de la solución estándar de arsénico contiene el equivalente a 1 µg de arsénico. Conservar esta solución en un recipiente de vidrio y emplearla dentro de los tres días de preparada.

Método I

Solución estándar - Transferir 3,0 ml de la *Solución estándar de arsénico* al generador de arsina y diluir con agua hasta obtener un volumen de 35 ml.

Solución muestra - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, transferir al generador de arsina la cantidad, en g, de la sustancia en ensayo calculada por la fórmula siguiente:

$$3{,}0/L$$

en la cual L es el límite de arsénico en ppm. Disolver en agua hasta obtener un volumen de 35 ml.

Procedimiento - Agregar a la *Solución muestra* y a la *Solución estándar* 20 ml de ácido sulfúrico 7 N, 2 ml de ioduro de potasio (SR), 0,5 ml de cloruro estañoso concentrado (SR) y 1 ml de alcohol isopropílico. Mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Colocar en la unidad depuradora dos trozos de algodón previamente impregnados con solución saturada de acetato de plomo, exprimidos para eliminar el exceso de solución y secados al vacío a temperatura ambiente, dejando un pequeño espacio de 2 mm entre las dos porciones de algodón. Lubricar las juntas esmeriladas con grasa apta para emplearse con solventes orgánicos y conectar la unidad depuradora al tubo de absorción. Transferir 3,0 ml de dietilditiocarbamato de plata (SR) al tubo de absorción. Agregar 3,0 g de cinc granulado (malla N° 20) a la mezcla contenida en el generador de arsina e inmediatamente conectar la unidad depuradora al mismo. Colocar el sistema en un baño de agua a 25 ± 3 °C y permitir la formación de hidrógeno y el desarrollo de color durante 45 minutos agitando el sistema suavemente a intervalos de 10 minutos. Desconectar el tubo de absorción y la unidad depuradora del generador de arsina y transferir la solución a celdas de absorción de 1 cm.

El color rojo producido por la *Solución muestra* no debe ser mayor que el producido por la *Solución estándar*. Si fuera necesario, determinar la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción, entre 535 y 540 nm, en un espectrofotómetro o colorímetro apropiado, empleando dietilditiocarbamato de plata (SR) como blanco.

Método II

Precaución - Se deben tomar medidas de seguridad en todo momento ya que algunas sustancias pueden reaccionar en forma explosiva cuando se oxidan con peróxido de hidrógeno.

[NOTA 1: si se trabaja con compuestos que contienen halógenos, calentar las muestras con ácido sulfúrico a menor temperatura, evitando que la mezcla entre en ebullición y agregar, con mucho cuidado, el peróxido de hidrógeno antes de efectuar la carbonización, para prevenir la pérdida de arsénico trivalente.]

[NOTA 2: si la sustancia en ensayo reacciona rápidamente y comienza a carbonizarse con 5 ml de ácido sulfúrico antes de calentarse, emplear en su lugar 10 ml de ácido sulfúrico diluido (1 en 2) y frío, y agregar unas pocas gotas de peróxido de hidrógeno antes de calentar.]

Solución estándar - Transferir 3,0 ml de *Solución estándar de arsénico* al generador de arsina; agregar 2 ml de ácido sulfúrico y mezclar. Agregar el volumen de peróxido de hidrógeno al 30 % empleado en la *Solución muestra*. Calentar la mezcla hasta que se desprendan vapores fuertes. Dejar enfriar y agregar con cuidado 10 ml de agua y nuevamente calentar hasta que se produzcan vapores fuertes. Se debe repetir este procedimiento con otros 10 ml de agua para eliminar cualquier traza del peróxido de hidrógeno. Enfriar y diluir con agua hasta 35 ml.

Solución muestra - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, transferir al generador de arsina la cantidad, en g, de la sustancia en ensayo calculada por la fórmula siguiente:

$$3{,}0/L$$

en la cual L es el límite de arsénico en ppm.

Agregar a la muestra 5 ml de ácido sulfúrico, algunas perlas de vidrio y digerir calentando preferiblemente sobre una placa calefactora, debajo de una campana de ventilación a una temperatura no mayor de 120 °C, hasta que se inicie la carbonización. Agregar más ácido sulfúrico, si fuera necesario, para humedecer completamente la muestra pero se debe tener en cuenta que el volumen total agregado no puede ser mayor de 10 ml. Agregar cuidadosamente, gota a gota, la solución de peróxido de hidrógeno al 30 %, esperando entre gota y gota a que la reacción cese antes de efectuar la siguiente adición. Agregar las primeras gotas muy lentamente con agitación constante para evitar una reacción violenta. Interrumpir el calentamiento si el desprendimiento de gases es excesivo. Cuando la reacción ha terminado, calentar cuidadosamente, rotando el generador de arsina ocasionalmente, para evitar que algunas porciones de la muestra queden adheridas a las paredes del generador de arsina. Mantener las condiciones de oxidación durante la digestión agregando pequeñas cantidades de solución de peróxido de hidrógeno al 30 %, cada vez que la mezcla se tome de color marrón o se oscurezca. Continuar la digestión hasta que la materia orgánica se destruya y se desprendan abundantes vapores de trióxido de azufre y que la solución sea incolora o presente solamente un color amarillo pálido. Enfriar y agregar cuidadosamente 10 ml de agua, mezclar y evaporar nuevamente hasta que aparezcan vapores fuertes. Si fuera necesario, repetir el procedimiento para eliminar cualquier traza de peróxido de hidrógeno. Enfriar, lavar las paredes del generador de arsina con 10 ml de agua y diluir con agua a 35 ml.

Procedimiento - Proceder según se indica en *Procedimiento* para el *Método I.*

Interferencias químicas - Los metales o las sales de metales como el cromo, cobalto, cobre, mercurio, molibdeno, níquel, paladio y plata, pueden interferir con la formación de arsina. El antimonio que forma estibina produce una interferencia positiva en el desarrollo del color con dietilditiocarbamato de plata (SR). Cuando se sospecha la presencia de antimonio, el color rojo que se produce en las dos soluciones de dietilditiocarbamato de plata, puede ser comparado a la longitud de onda de máxima absorción entre 535 y 540 nm con un colorímetro apropiado ya que a esta longitud de onda la interferencia debida a la estibina es despreciable.

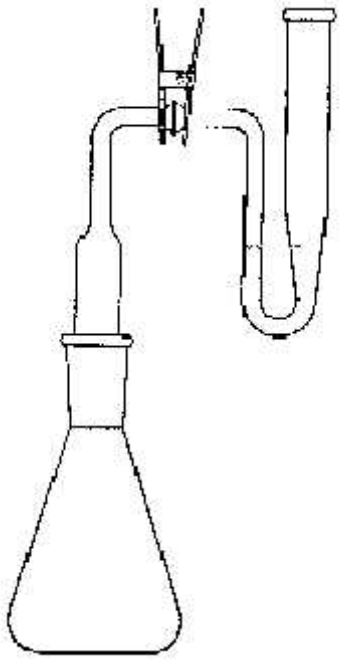


Figura. Aparato para el ensayo límite de arsénico.

550. LÍMITE DE CALCIO, POTASIO Y SODIO

Para la determinación de estos elementos, emplear un fotómetro de llama.

Solución estándar de calcio - Transferir 249,7 mg de carbonato de calcio, previamente secado durante 3 horas a 300 °C y enfriado en un desecador durante 2 horas, a un matraz aforado de 100 ml. Agregar 20 ml de agua y 5 ml de solución de ácido clorhídrico 3 N, agitar hasta disolución, completar a volumen con agua y mezclar. Cada ml contiene 1,00 mg de calcio.

Solución estándar de potasio - Transferir 190,7 mg de cloruro de potasio, previamente secado durante 2 horas a 105 °C, a un matraz aforado de 100 ml. Disolver con agua, completar a volumen y mezclar. Cada ml contiene 1,00 mg de potasio.

Solución estándar de sodio – Transferir 254,2 mg de cloruro de sodio, previamente secado durante 2 horas a 105 °C, a un matraz aforado de 100 ml. Disolver con agua, completar a volumen y mezclar. Cada ml contiene 1,00 mg de sodio.

Solución muestra - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, transferir 2,00 g de muestra a un matraz aforado de 100 ml, enfriar en un baño de hielo y agregar 5 ml de ácido nítrico concentrado. Agitar hasta disolución y dejar reposar a temperatura ambiente. Si la solución resultante presenta turbidez, calentar suavemente hasta obtener una solución transparente. Dejar reposar a temperatura ambiente, completar a volumen con agua y mezclar. Si fuera necesario, filtrar o centrifugar para obtener una solución transparente o ligeramente turbia.

Solución estándar - Transferir 50 ml de la *Solución muestra* a un matraz aforado de 100 ml, agregar los volúmenes de *Soluciones estándar de calcio, potasio o sodio* indicados en la monografía correspondiente, completar a volumen con agua y mezclar. Diluir alícuotas de esta solución con agua hasta obtener una concentración apropiada del elemento en ensayo.

Procedimiento - Ajustar el fotómetro de llama para obtener una lectura con la *Solución estándar* lo más cercana posible al 100 % de transmitancia, a la longitud de onda de máxima emisión, según se indica en la *Tabla*. Emplear como ancho de rendija de salida un valor lo más cercano posible al ancho de banda designado Registrar la lectura de transmitancia y designarla con la letra *S*. Diluir las alícuotas de la *Solución muestra* con agua para obtener una solución con una concentración similar a la de la *Solución estándar*. Sin cambiar ninguno de los ajustes realizados en el fotómetro de llama, registrar la lectura de transmitancia de la *Solución muestra* y designarla con la letra *T*. Reajustar solamente el monocromador a la longitud de onda asignada como corrección de fondo. Registrar la lectura de transmitancia de la *Solución muestra* a esta longitud de onda y designarla con la letra *B*. El ensayo es válido si el valor de *T* menos *B* es menor o igual que el valor de *S* menos *T*.

Tabla.

	Longitud de onda (nm)		
Elemento	Máxima	Corrección de fondo	Ancho de banda (nm)
Calcio	422,7	430	0,8
Potasio	766,5	750	12
Sodio	589,0	580	0,8

560. LIMITE DE CLORURO Y SULFATO

Preparar la *Solución muestra* y la *Solución de comparación* empleando tubos de Nessler (ver *Consideraciones generales*). Emplear cantidades iguales de los reactivos, tanto para la *Solución muestra* como para la *Solución de comparación*. Si después de la acidificación, la solución no está perfectamente límpida, filtrarla a través de un papel de filtro libre de cloruro y sulfato. Según corresponda, agregar el precipitante, nitrato de plata (SR) o cloruro de bario (SR) a la *Solución muestra* y a la *Solución de comparación*.

Cuando en la monografía correspondiente se especifique la realización de este ensayo sobre un volumen específico de *Solución muestra* y el límite para cloruro o sulfato corresponda a 0,20 ml o menos de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico 0,020 N respectivamente, realizar el ensayo sobre la solución sin diluir. En tales casos mantener la misma relación de volumen para la *Solución de comparación* y la *Solución muestra.* Cuando se realiza el ensayo sobre sales de metales pesados, que presentan normalmente una reacción ácida, omitir la acidificación y no neutralizar la solución. En el caso de las sales de bismuto, disolverlas en la menor cantidad de agua y 2 ml de ácido nítrico antes del tratamiento con el agente precipitante.

Cloruro - Disolver la cantidad especificada de la sustancia en ensayo en 30 a 40 ml de agua o, si la muestra está en solución, agregar agua hasta obtener un volumen total entre 30 y 40 ml y, si fuera necesario, neutralizar la solución con ácido nítrico empleando papel de tornasol como indicador. Agregar 1 ml de ácido nítrico, 1 ml de nitrato de plata (SR) y cantidad suficiente de agua para obtener 50 ml. Mezclar, dejar en reposo durante 5 minutos protegido de la luz solar directa y comparar la turbidez con la producida en una solución que contiene el volumen de ácido clorhídrico 0,020 N especificado en la monografía correspondiente.

Sulfato - Disolver la cantidad especificada de la sustancia en ensayo en 30 a 40 ml de agua o, si la muestra está en solución, agregar agua hasta obtener un volumen total entre 30 y 40 ml y, si fuera necesario, neutralizar la solución con ácido clorhídrico empleando papel de tornasol como indicador. Agregar 1 ml de ácido clorhídrico 3 N, 3 ml de cloruro de bario (SR) y cantidad suficiente de agua para obtener 50 ml. Mezclar, dejar en reposo durante 10 minutos y comparar la turbidez con la producida en una solución que contiene el volumen de ácido sulfúrico 0,020 N especificado en la monografía correspondiente.

570. LIMITE DE DIMETILANILINA

Este ensayo constituye un procedimiento general para la determinación de dimetilamina empleando cromatografía de gases (ver *100. Cromatografía*).

Sistema cromatográfico - Emplear un equipo para cromatografía de gases con un detector de ionización a la llama y una columna de 2 m x 2 mm rellena con una fase líquida constituida por 50 % de fenilsilicona y 50 % de metilpolisiloxano al 3 % sobre un soporte silanizado de tierra silícea para cromatografía de gases calcinada con carbonato de sodio a 900 °C, lavada con ácido y luego con agua hasta neutralidad. Mantener la columna a 120 °C. Se emplea nitrógeno como gas transportador con un caudal de aproximadamente 30 ml por minuto.

Solución del estándar interno - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, preparar una solución de naftaleno en ciclohexano para obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 50 µg por ml.

Solución estándar - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, transferir aproximadamente 50,0 mg de *N*,*N*-dimetilanilina, exactamente pesados, a un matraz aforado de 50 ml. Agregar 25 ml de ácido clorhídrico 1 N, agitar por rotación hasta disolver, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 5,0 ml de la solución resultante a un matraz aforado de 250 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Transferir 1,0 ml de esta solución a un tubo de centrífuga, agregar 5,0 ml de hidróxido de sodio 1 N y 1 ,0 ml de *Solución del estándar interno*, agitar vigorosamente durante 1 minuto y centrifugar. Emplear la solución sobrenadante transparente.

Solución muestra - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, transferir aproximadamente 1,0 g de la muestra, exactamente pesado, a un tubo de centrífuga, agregar 5 ml de hidróxido de sodio 1 N y agitar por rotación hasta disolución. Agregar 1,0 ml de *Solución del estándar interno*, agitar vigorosamente durante 1 minuto y centrifugar. Emplear la solución sobrenadante transparente.

Procedimiento – Inyectar por separado en el cromatógrafo volúmenes iguales (aproximadamente 20 µl) de la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, registrar los cromatogramas y medir las respuestas de los picos principales. El cociente entre las respuestas de los picos de dimetilanilina y naftaleno, obtenidos a partir de la *Solución muestra* no debe ser mayor que el obtenido a partir de la *Preparación estándar* (0,002 %).

580. LIMITE DE HIERRO

Este ensayo se emplea para determinar que el contenido de hierro, férrico o ferroso, no excede el límite especificado en la monografía correspondiente. La determinación se realiza mediante la comparación visual con un control preparado a partir de una solución estándar de hierro.

Reactivos especiales

Solución estándar de hierro - Disolver 863,4 mg de sulfato férrico amónico [$FeNH_4(SO_4)_2$. 12H2O] en cantidad suficiente de agua, agregar 10 ml de ácido sulfúrico 2 N y diluir con agua hasta completar 100,0 ml. Transferir 10 ml de esta solución a un matraz aforado de 1 litro, agregar 10 ml de ácido sulfúrico 2 N, diluir a volumen con agua y mezclar. Esta solución contiene el equivalente a 10 µg de hierro por ml.

Solución de tiocianato de amonio - Disolver 30 g de tiocianato de amonio en agua para obtener 100 ml.

Solución estándar - Transferir 1 ml de *Solución estándar de hierro* (10 µg de Fe) a un tubo de Nessler de 50 ml, diluir con agua a 45 ml, agregar 2 ml de ácido clorhídrico y mezclar.

Solución muestra - Transferir la solución preparada para el ensayo según se indica en la monografía correspondiente a un tubo de Nessler de 50 ml y, si fuera necesario, diluir con agua a 45 ml o disolver en agua y luego diluir a 45 ml la cantidad de la sustancia en ensayo, en g, calculada por la fórmula siguiente:

$$1/(1.000L)$$

en la cual L es el límite de hierro en porcentaje. Agregar 2 ml de ácido clorhídrico y mezclar.

Procedimiento - A cada uno de los tubos que contienen la *Solución estándar* y la Solución *muestra* agregar 50 mg de cristales de persulfato de amonio, 3 ml de *Solución de tiocianato de amonio* y mezclar: el color de la solución obtenida a partir de la *Solución muestra* no debe ser más intenso que el de la solución obtenida a partir de la *Solución estándar*.

Actualización total

590. LÍMITE DE METALES PESADOS

Este ensayo se emplea para establecer que el contenido de impurezas metálicas que reaccionan con el ión sulfuro, bajo las condiciones especificadas, no excede el *Límite de metales pesados* especificado en la monografía correspondiente, expresado como porcentaje (en peso) de plomo en la sustancia en ensayo, determinado mediante comparación visual (ver *Comparación visual* en *Consideraciones generales*) con un control preparado a partir de una *Solución estándar de plomo.*

[NOTA: los cationes que generalmente responden a este ensayo son: plomo, mercurio, bismuto, arsénico, antimonio, estaño, cadmio, plata, cobre y molibdeno.]

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, emplear el *Método I.*

Reactivos especiales

Solución madre de nitrato de plomo - Disolver 159,8 mg de nitrato de plomo en 100 ml de agua a la cual se le ha agregado 1 ml de ácido nítrico y diluir a 1 litro con agua. Preparar y almacenar esta solución en envases de vidrio exentos de sales de plomo solubles.

Solución estándar de plomo (100 ppm) - Disolver 400 mg de nitrato de plomo en agua y diluir a 250 ml con el mismo solvente. En el día del ensayo, diluir 1 ml de esta solución a 10 ml con agua.

Solución estándar de plomo (10 ppm) - En el día del ensayo, diluir 10,0 ml de *Solución madre de nitrato de plomo* a 100,0 ml con agua. Cada ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm)* contiene el equivalente a 10 µg de plomo. Una solución de comparación preparada sobre la base de 100 µl de *Solución estándar de plomo (10 ppm)* por g de muestra contiene el equivalente a 1 ppm de plomo.

Solución estándar de plomo (2 ppm) - En el día del ensayo, diluir 1,0 ml de *Solución estándar de plomo (100 ppm)* a 50,0 ml con agua. Cada ml de *Solución estándar de plomo (2 ppm)* contiene el equivalente a 2,0 µg de plomo.

Solución estándar de plomo (1 ppm) - En el día del ensayo, diluir 1,0 ml de *Solución estándar de plomo (100 ppm)* a 100,0 ml con agua. Cada ml de *Solución estándar de plomo (1 ppm)* contiene el equivalente a 1,0 µg de plomo.

Solución estándar de plomo (0,1 ppm) - En el día del ensayo, diluir 1,0 ml de *Solución estándar de plomo (1 ppm)* a 10 ml con agua. Cada ml de *Solución estándar de plomo (0,1 ppm)* contiene el equivalente a 0,1 µg de plomo.

[NOTA: siempre que en una monografía individual aparezca la denominación *Solución estándar de plomo* sin ninguna especificación de concentración, se debe emplear la *Solución estándar de plomo (10 ppm)*.]

Método I

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Disolver 50 g de acetato de amonio en 100 ml de ácido clorhídrico 6 N, ajustar a pH 3,5, si fuera necesario, con hidróxido de amonio 6 N o ácido clorhídrico 6 N y diluir con agua a 200 ml.

Solución estándar - Transferir 2 ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm)*, correspondientes a 20 µg de Pb, a un tubo de Nessler de 50 ml y diluir con agua a 25 ml. Ajustar a pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético 1 N o hidróxido de amonio 6 N, empleando papel indicador de pH, diluir con agua a 40 ml y mezclar.

Solución muestra - Transferir 25 ml de la solución preparada para el ensayo según se indica en la monografía correspondiente a un tubo de Nessler de 50 ml. Alternativamente, cuando se indique en la monografía correspondiente, emplear el volumen de ácido indicado, disolver la cantidad en g de muestra, calculada por la fórmula siguiente:

$$2{,}0/(1.000L)$$

en la cual L es el *Límite de metales pesados*, en porcentaje. Diluir a 25 ml con agua y ajustar a pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético 1 N o hidróxido de amonio 6 N, empleando papel indicador de pH, diluir a 40 ml con agua y mezclar.

Solución control - Transferir 25 ml de una solución preparada según se indica para la *Solución muestra* a un tercer tubo de Nessler de 50 ml y agregar 2,0 ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm).* Ajustar a pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético 1 N o hidróxido de amonio 6 N, empleando papel indicador de pH, diluir a 40 ml con agua y mezclar.

Procedimiento - A cada uno de los tubos que contienen la *Solución estándar*, la *Solución muestra* y la *Solución control*, respectivamente, agregar 1,2 ml de tioacetamida-glicerina básica (SR) y 2 ml de *Solución reguladora de acetato de pH 3,5*, diluir a 50 ml con agua, mezclar, dejar reposar durante 5 minutos y observar longitudinalmente sobre una superficie blanca: el color de la solución obtenida a partir de la *Solución muestra* no debe ser más oscuro que el de la obtenida a partir de la *Solución estándar* y la intensidad del color de la *Solución*

control debe ser igual o mayor que la de la *Solución estándar*.

[NOTA: si el color de la *Solución control* es más claro que el de la *Solución estándar*, emplear el *Método II*.]

Método II

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Preparar según se indica en *Método I.*

Solución estándar - Preparar según se indica en *Método I.*

Solución muestra - Emplear una cantidad en g de muestra calculada por la fórmula siguiente:

$$2{,}0/(1.000L)$$

en la cual *L* es el *Límite de metales pesados*, en porcentaje. Transferir la cantidad de muestra pesada a un crisol, agregar suficiente ácido sulfúrico para impregnar la sustancia y someter cuidadosamente a ignición hasta que la sustancia se carbonice por completo. [NOTA: cubrir el crisol parcialmente durante la carbonización.] Agregar a la masa carbonizada 2 ml de ácido nítrico y 5 gotas de ácido sulfúrico y calentar con cuidado hasta que no se desprendan vapores blancos. Someter a ignición, en una mufla, entre 500 y 600 °C, hasta que el residuo carbonoso desaparezca. Dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar 4 ml de ácido clorhídrico 6 N, tapar el crisol y transferir a un baño de vapor durante 15 minutos. Destapar y evaporar lentamente hasta sequedad. Agregar al residuo 1 gota de ácido clorhídrico, 10 ml de agua caliente y digerir durante 2 minutos. Agregar hidróxido de amonio 6 N, gota a gota, hasta que la solución sea alcalina frente al papel de tornasol, diluir a 25 ml con agua y ajustar a pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético 1 N empleando papel indicador de pH de intervalo estrecho. Filtrar, si fuera necesario, lavar el crisol y el filtro con 10 ml de agua, combinar el filtrado y el agua de lavado en un tubo de Nessler de 50 ml, diluir a 40 ml con agua y mezclar.

Procedimiento - A cada uno de los tubos que contienen la *Solución estándar* y la *Solución muestra*, respectivamente, agregar 1,2 ml de tioacetamida-glicerina básica (SR) y 2 ml de *Solución reguladora de acetato pH 3,5*, diluir a 50 ml con agua, mezclar, dejar reposar durante 5 minutos y observar longitudinalmente sobre una superficie blanca: el color de la solución obtenida a partir de la *Solución muestra* no debe ser más oscuro que el de la solución obtenida a partir de la *Solución estándar.*

Método III

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Preparar según se indica en *Método I***.**

Solución estándar - Transferir una mezcla de 8 ml de ácido sulfúrico y 10 ml de ácido nítrico a un matraz de Kjeldahl de 100 ml. Agregar un volumen adicional de ácido nítrico igual al agregado a la *Solución muestra.* Calentar la solución hasta desprendimiento de vapores densos y blancos, enfriar y agregar con cuidado 10 ml de agua. Si se empleó peróxido de hidrógeno al 30 % al tratar la *Solución muestra*, agregar el mismo volumen de peróxido de hidrógeno y calentar a ebullición suavemente hasta que se desprendan vapores densos y blancos. Enfriar a temperatura ambiente, agregar con cuidado 5 ml de agua, mezclar y calentar a ebullición suavemente hasta la producción de vapores blancos y obtener un volumen de 2 a 3 ml. Enfriar, diluir con cuidado con 2 a 5 ml de agua, agregar 2,0 ml de *Solución estándar de plomo (10 ppm)*, correspondientes a 20 µg de Pb, y mezclar. Transferir a un tubo de Nessler de 50 ml, lavar el matraz con agua, agregando los lavados al tubo hasta completar un volumen de 25 ml y mezclar.

Solución muestra -

Si la sustancia es sólida - Transferir la cantidad de muestra especificada en la monografía correspondiente a un matraz de Kjeldahl de 100 ml. [NOTA: emplear un matraz de 300 ml si la reacción genera espuma en exceso.] Inclinar el matraz a 45° y agregar, con cuidado, cantidad suficiente de una mezcla de 8 ml de ácido sulfúrico y 10 ml de ácido nítrico para impregnar la muestra. Calentar suavemente hasta que la reacción comience, dejar que la reacción disminuya y agregar porciones adicionales de la misma mezcla hasta un volumen final de 18 ml. Calentar suavemente a ebullición hasta que la solución se oscurezca. Enfriar a temperatura ambiente, agregar 2 ml de ácido nítrico y calentar nuevamente hasta que la solución se oscurezca. Continuar calentando luego del agregado de ácido nítrico hasta que la mezcla no presente oscurecimiento. Luego calentar fuertemente hasta la producción de vapores densos y blancos. Enfriar, agregar con cuidado 5 ml de agua, calentar suavemente a ebullición hasta la producción de vapores densos, blancos y continuar calentando hasta que el volumen se reduzca a unos pocos ml. Enfriar a temperatura ambiente, agregar con cuidado 5 ml de agua y examinar el color de la solución. Si el color es amarillo, agregar con cuidado 1 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % y nuevamente evaporar hasta la producción de vapores blancos y obtener un volumen de 2 a 3 ml. Si la solución sigue siendo amarilla, agregar 5 ml de agua y repetir el tratamiento con peróxido de hidrógeno. Enfriar, diluir con cuidado con 2 a 5 ml de agua, lavar y transferir a un tubo de Nessler de 50 ml, teniendo cuidado que el volumen total no exceda los 25 ml.

Si la sustancia es líquida - Transferir la cantidad de muestra especificada en la monografía

correspondiente a un matraz de Kjeldahl de 100 ml. [NOTA: emplear un matraz de 300 ml si la reacción genera espuma en exceso.] Inclinar el matraz a 45° y agregar, con cuidado, unos pocos ml de una mezcla de 8 ml de ácido sulfúrico y 10 ml de ácido nítrico. Calentar suavemente hasta que la reacción comience, dejar que la reacción disminuya y proceder según se indica en *Si la sustancia es un sólido*, comenzando donde dice "*agregar porciones adicionales de la misma mezcla hasta un volumen final de 18 ml...*".

Procedimiento - Tratar la *Solución muestra* y la *Solución estándar* del siguiente modo: ajustar a pH entre 3,0 y 4,0, empleando papel indicador de pH de intervalo estrecho, con hidróxido de amonio (puede emplearse una solución de amoníaco diluido, cuando el intervalo especificado es estrecho), agregar agua hasta 40 ml y mezclar. Agregar a cada tubo 1,2 ml de tioacetamida-glicerina básica (SR) y 2 ml de *Solución reguladora de acetato pH 3,5*, diluir a 50 ml con agua, mezclar, dejar reposar durante 5 minutos y observar longitudinalmente sobre una superficie blanca: el color de la *Solución muestra* no debe ser más oscuro que el de la *Solución estándar*.

Método IV

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Preparar según se indica en *Método I.*

Solución estándar - A 10 ml de *Solución estándar de plomo (1 ppm)* o *Solución estándar de plomo (2 ppm)*, según se indique en la monografía correspondiente, agregar 2 ml de *Solución muestra* y mezclar.

Solución muestra - Preparar según se indica en la monografía correspondiente. Emplear 12 ml de esta solución.

Solución control - A 10 ml de agua agregar 2 ml de la *Solución muestra* y mezclar.

Procedimiento - A cada uno de los tres tubos que contienen la *Solución estándar*, la *Solución muestra* y la *Solución control*, respectivamente, agregar 2 ml de *Solución reguladora de acetato pH 3,5* y 1,2 ml de tioacetamida-glicerina básica (SR) y mezclar: la *Solución estándar* debe presentar una ligera coloración parda cuando se compara con la *Solución control*. Dejar reposar durante aproximadamente 2 minutos: si la *Solución muestra* presentase coloración parda, esta no debe ser más intensa que la de la *Solución estándar.*

Método V

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Preparar según se indica en *Método I.*

Solución estándar - A 10 ml de una solución de plomo de 1 ó 2 ppm, según se indique en la monografía correspondiente, preparada a partir de la *Solución estándar de plomo (100 ppm)* por dilución con el solvente especificado para preparar la *Solución muestra*, agregar 2 ml de *Solución muestra* y mezclar.

Solución muestra - Disolver la cantidad de sustancia a examinar en un solvente orgánico (dioxano, acetona, etc.) que contenga un mínimo porcentaje de agua (15 %), procediendo según se indica en la monografía correspondiente. Emplear 12 ml de esta solución.

Solución control - A 10 ml del solvente empleado para preparar la *Solución muestra* agregar 2 ml de *Solución muestra* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica para *Método IV*. La *Solución estándar* debe presentar una ligera coloración parda cuando se compara con la *Solución control*. Dejar reposar durante aproximadamente 2 minutos: si la *Solución muestra* presentase coloración parda, esta no debe ser más intensa que la de la *Solución estándar*.

Método VI

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Preparar según se indica en *Método I*.

Solución estándar - Mezclar 4 ml de una solución de sulfato de magnesio al 25 % en ácido sulfúrico diluido y el volumen de *Solución estándar de plomo (10 ppm)* especificado en la monografía correspondiente. Mezclar con una varilla de vidrio y calentar cuidadosamente. Si la mezcla es líquida, evaporar suavemente sobre un baño de agua hasta sequedad. Calentar hasta calcinación para obtener un residuo prácticamente blanco, o a lo sumo grisáceo, sin que la temperatura supere los 800 ºC. Dejar secar y humedecer el residuo obtenido con unas gotas de ácido sulfúrico diluido. Evaporar y calcinar nuevamente y luego enfriar. [NOTA: la duración total de la calcinación no debe ser mayor de 2 horas]. Recuperar el residuo empleando dos porciones de 5 ml de ácido clorhídrico diluido, agregar 0,1 ml de fenoftaleína (SR1) y luego amoníaco concentrado hasta coloración rosada. Enfriar, agregar ácido acético glacial hasta decoloración y luego agregar 0,5 ml en exceso. Si fuera necesario, filtrar y lavar el filtro. Diluir esta solución a 20 ml con agua. Transferir 10 ml de esta solución a un tubo de ensayo y agregar 2 ml de *solución muestra*.

Solución muestra - Introducir la cantidad de sustancia a examinar según se especifique en la monografía correspondiente (como máximo 2 g) en un crisol de sílice y agregar 4 ml de una solución de sulfato de magnesio al 25 % en ácido sulfúrico diluido. Proceder según se indica para la *Solución estándar*, comenzando donde dice *"Mezclar con una varilla fina..."* hasta *"Diluir esta solución a 20 ml con agua*". Emplear 12 ml de esta solución.

Solución control - A 10 ml de agua agregar 2 ml de la *Solución muestra* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica para *Método IV*. La *Solución estándar* debe presentar una ligera coloración parda cuando se compara con la *Solución control*. Dejar reposar durante aproximadamente 2 minutos: si la *Solución muestra* presentase coloración parda, esta no debe ser más intensa que la de la *Solución estándar*.

Método VII

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Preparar según se indica en *Método I.*

Solución estándar - A 0,5 g de óxido de magnesio, agregar la cantidad de *Solución estándar de plomo (10 ppm)* según se especifique en la monografía correspondiente y secar en estufa entre 100 y 105 °C. Calcinar hasta obtener una masa homogénea blanco o blanco-grisacea. Si luego de 30 minutos de calcinación la masa permanece coloreada, dejar enfriar, mezclar con una varilla fina de vidrio y calcinar nuevamente. Si fuera necesario, repetir esta operación. Calentar a 800 °C durante 1 hora y recuperar el residuo empleando dos porciones de 5 ml de una mezcla de agua y ácido clorhídrco al 25 % p/v (1:1). Agregar 0,1 ml de fenolftaleína (SR1) y luego amoniaco concentrado hasta coloración rosada. Enfriar, agregar ácido acético glacial hasta decoloración y luego agregar 0,5 ml en exceso. Si fuera necesario, filtrar y lavar el filtro. Diluir esta solución a 20 ml con agua. Transferir 10 ml de esta solución a un tubo de ensayo y agregar 2 ml de *Solución muestra*.

Solución muestra - Introducir la cantidad de sustancia a examinar según se especifique en la monografía correspondiente en un crisol de sílice y mezclar con 0,5 g de óxido de magnesio. Proceder según se indica para la *Solución estándar*, comenzando donde dice *"Calcinar hasta obtener una masa homogénea..."* hasta *"Diluir esta solución a 20 ml con agua"*. Emplear 12 ml de esta solución.

Solución control - A 10 ml de agua agregar 2 ml de la *Solución muestra* y mezclar.

Procedimiento - Proceder según se indica para *Método IV*. La *Solución estándar* debe presentar una ligera coloración parda cuando se compara con la *Solución control*. Dejar reposar durante aproximadamente 2 minutos: si la *Solución muestra* presentase coloración parda, esta no debe ser más intensa que la de la *Solución estándar*.

Método VIII

Solución reguladora de acetato pH 3,5 - Preparar según se indica en *Método I.*

Aparato - Preparar el dispositivo de filtración indicado en la *Figura*, adaptando el tubo de una jeringa de 50 ml, sin su émbolo, a un portafiltros que contenga una membrana filtrante de unos 13 mm de diámetro y 3 µm de tamaño de poro y sobre esta, un prefiltro del mismo diámetro.

Solución estándar - Transferir el volumen de *Solución estándar de plomo (1 ppm)* según se especifique en la monografía correspondiente al tubo de la jeringa, colocar el émbolo y aplicar una presión uniforme hasta haber filtrado todo el líquido. Abrir el portafiltros, retirar el prefiltro y comprobar que la membrana filtrante no esté contaminada con impurezas. Si la membrana estuviese contaminada, reemplazarla y repetir la filtración en las mismas condiciones.

Solución muestra - Disolver la cantidad de sustancia a examinar según se especifique en la monografía correspondiente, en 30 ml de agua o el volumen indicado en la monografía correspondiente. Proceder según se indica para la *Solución estándar.*

Procedimiento - Agregar 2 ml de *Solución reguladora de acetato pH 3,5* y 1,2 ml de tioacetamida-glicerina básica (SR), al filtrado o al volumen especificado del mismo de la *Solución muestra*. Mezclar, dejar en reposo durante 10 minutos y filtrar nuevamente pero invirtiendo las posiciones del prefiltro y la membrana filtrante, de modo que el líquido pase primero por la membrana filtrante y luego por el prefiltro [NOTA: esta operación debe realizarse lenta y uniformemente, aplicando una presión moderada y constante sobre el émbolo de la jeringa]. Luego de haber filtrado todo el líquido, abrir el portafiltros, retirar la membrana filtrante y secar con papel de filtro. Proceder del mismo modo con la *Solución estándar*. El color de la mancha obtenida a partir de la *Solución muestra* no debe ser más intenso que el obtenido con la *Solución estándar*.

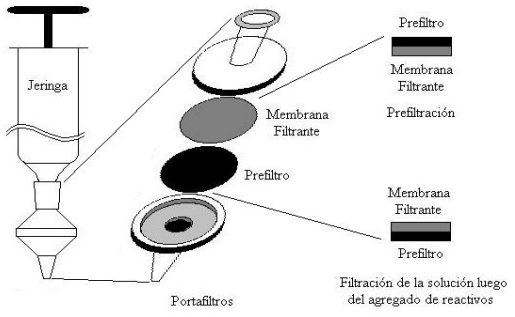


Figura. Dispositivo para prefiltrar y filtrar las soluciones de ensayo. Vista de la disposición del prefiltro y la membrana filtrante en las diferentes etapas del ensayo.

600. LIMITE DE PLOMO

Para este ensayo se deben almacenar todos los reactivos y soluciones en envases de vidrio al borosilicato. Lavar perfectamente todos los materiales de vidrio a e mplear con ácido nítrico diluido 1 en 2 y luego con agua.

Precaución - *Todo este procedimiento debe realizarse bajo campana. El operador debe extremar las medidas de seguridad ya que puede liberarse ácido cianhídrico y algunas sustancias pueden producir explosiones violentas cuando son digeridas con peróxido de hidrógeno.*

Reactivos

Solución de amoníaco-cianuro - Disolver 2 g de cianuro de potasio en 15 ml de hidróxido de amonio y diluir con agua a 100 ml.

Solución de ditizona para extracción - Disolver 30 mg de ditizona en 1 litro de cloroformo y agregar 5 ml de alcohol. Almacenar esta solución en un sitio frío. Antes de emplear, agitar un volumen determinado de esta solución con aproximadamente la mitad de su volumen de ácido nítrico diluido (1 en 100) en una ampolla de decantación y descartar el ácido nítrico.

Solución de citrato de amonio - Disolver 40 g de ácido cítrico en 90 ml de agua. Agregar 2 ó 3 gotas de rojo de fenol (SR) y luego agregar, cuidadosamente, hidróxido de amonio hasta que la solución se torne de color rojizo. Extraer el plomo que pudiera estar presente en la solución, con porciones de 20 ml de *Solución de ditizona para extracción*, hasta que ésta mantenga su color verde anaranjado.

Solución estándar de plomo diluida - Diluir un volumen, exactamente medido, de Solución estándar de plomo (ver *590. Límite de metales pesados*) que contenga 10 µg de plomo por ml (10 ppm) con 9 volúmenes de ácido nítrico diluido (1 en 100), hasta obtener una solución que contenga 1 µg de plomo por ml (1 ppm).

Solución de clorhidrato de hidroxilamina - Disolver 20 g de clorhidrato de hidroxilamina en cantidad suficiente de agua y diluir hasta obtener 65 ml de solución. Transferir a u na ampolla de decantación y agregar 5 gotas de azul de timol (SR). Luego agregar hidróxido de amonio hasta que la solución adquiera un color amarillo. Agregar 10 ml de una solución de dietilditiocarbamato de sodio (1 en 25), mezclar y dejar en reposo 5 minutos. Extraer esta solución con porciones sucesivas de 10 a 15 ml de cloroformo hasta que una porción de 5 ml del extracto clorofórmico no presente un color amarillo cuando se agita con sulfato cúprico (SR). Agregar ácido clorhídrico 3 N hasta que la solución se torne de color rosado y luego diluir con agua a 100 ml.

Solución de cianuro de potasio - Disolver 50 g de cianuro de potasio en 100 ml de agua. Extraer el plomo de esta solución con porciones sucesivas de *Solución de ditizona para extracción*, según se indica en *Solución de citrato de amonio* y luego agitar con cloroformo para extraer cualquier resto de ditizona. Finalmente diluir con cantidad suficiente de agua para obtener una solución con una concentración al 10 % de cianuro de potasio.

Solución estándar de ditizona - Disolver 10 mg de ditizona en 1 litro de cloroformo. Almacenar esta solución en envase inactínico, con tapón de vidrio, exento de plomo. Conservar esta solución en un sitio frío.

Solución muestra - Cuando en la monografía no se especifique la preparación de la *Solución muestra*, proceder del siguiente modo.

Transferir 1,0 g de la muestra, exactamente pesado, a un matraz aforado. Agregar 5 ml de ácido sulfúrico y unas perlas de vidrio. Calentar lentamente sobre una placa calefactora hasta que comience la carbonización. [NOTA: si la muestra reacciona rápidamente y antes de calentar comienza a carbonizarse con los 5 ml de ácido sulfúrico, emplear en su lugar 10 ml de ácido sulfúrico diluido (1 en 2), enfriar y agregar unas gotas de peróxido de hidrógeno antes del calentamiento.] Si fuera necesario, agregar ácido sulfúrico hasta impregnar la muestra completamente en un volumen total que no exceda los 10 ml. Agregar lentamente peróxido de hidrógeno al 30 %, mezclar con cuidado para evitar una reacción rápida y discontinuar el calentamiento si la formación de espuma es excesiva. Agitar por rotación la solución en el matraz para impedir que la muestra que no haya reaccionado se aglutine en las paredes del mismo. Agregar más peróxido de hidrógeno si la mezcla se oscurece. Continuar el calentamiento hasta que se desprendan gases copiosos de trióxido de azufre y la solución se torne incolora. Enfriar y agregar, con cuidado, 10 ml de agua, evaporar hasta que nuevamente se desprendan gases de trióxido de azufre y enfriar. Repetir este procedimiento con otros 10 ml de agua para eliminar el peróxido de hidrógeno remanente. Diluir con 10 ml de agua y enfriar.

Procedimiento - Transferir la *Solución muestra* o el volumen de *Solución muestra* especificado en la monografía correspondiente a u na ampolla de decantación. [NOTA: si fuera necesario, lavar con

10 ml de agua.] Agregar 6 ml de *Solución de citrato de amonio* y 2 ml de *Solución de clorhidrato de hidroxilamina*. [NOTA: para la determinación de plomo en sales de hierro emplear 10 ml de *Solución de citrato de amonio*.] Agregar 2 gotas de rojo de fenol (SR) y alcalinizar la solución, mediante el agregado de hidróxido de amonio, hasta que se torne de color rojo. Si fuera necesario, enfriar la solución y agregar 2 ml de *Solución de cianuro de potasio*. De inmediato, extraer la solución con porciones de 5 ml de *Solución de ditizona para extracción* y eluir cada extracto en otra ampolla de decantación, hasta que la solución de ditizona mantenga su color verde. Agitar las soluciones combinadas durante 30 segundos con 20 ml de ácido nítrico diluido (1 en 100) y descartar la fase clorofórmica. Agregar a la solución ácida 5,0 ml de *Solución estándar de ditizona* y 4 ml de *Solución de amoníaco-cianuro*. Agitar durante 30 segundos: el color violeta de la fase clorofórmica no debe ser más intenso que el de una solución control preparada con un volumen de *Solución estándar de plomo diluida*.

610. LÍMITE DE SELENIO

Solución madre de selenio - Transferir 40,0 mg de selenio metálico a un matraz aforado de 1 litro. Disolver en 100 ml de ácido nítrico diluido (1 en 2) y, si fuera necesario, calentar suavemente para completar la disolución. Diluir a volumen con agua y mezclar. Transferir 5 ml de esta solución a un matraz aforado de 200 ml, completar a volumen con agua y mezclar. Cada ml de la solución resultante contiene el equivalente a 1 µg de selenio.

Solución de diaminonaftaleno - Disolver 100 mg de 2,3-diaminonaftaleno y 500 mg de clorhidrato de hidroxilamina en ácido clorhídrico 0,1 N para obtener 100 ml de solución. Preparar la solución el día del ensayo.

Solución estándar de selenio - Transferir 6 ml de *Solución madre* a un vaso de precipitados de 150 ml. Agregar 25 ml de agua y 25 ml de ácido nítrico diluido (1 en 30).

Solución muestra - Proceder según se indica en *60. Combustión en erlenmeyer con oxígeno*, empleando 100 ó 200 mg de muestra, un erlenmeyer de combustión de 1 litro y 25 ml de ácido nítrico diluido (1 en 30), como líquido absorbente, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. [NOTA: la combustión completa de la muestra es un factor importante en la realización de este ensayo. Cuando se especifique en la monografía correspondiente, agregar óxido de magnesio para obtener una combustión total.] Una vez finalizada la combustión, colocar unos ml de agua en el reservorio del erlenmeyer, aflojar el tapón y lavar con 10 ml de agua los componentes del aparato. Con la ayuda de 20 ml de agua, transferir la solución a un vaso de precipitados de 150 ml y calentar suavemente a temperatura de ebullición durante 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Solución blanco - Preparar una mezcla de 25 ml de agua y 25 ml de ácido nítrico diluido (1 en 30).

Procedimiento - Proceder con la *Solución estándar de selenio*, la *Solución muestra* y la *Solución blanco* en sucesión inmediata y en paralelo según se indica a continuación. Ajustar a pH 2,0 ± 0,2 con solución de hidróxido de amonio (1 en 2). Diluir con agua a 60 ml y transferir a una ampolla de decantación de vidrio inactínico. Lavar los vasos de precipitados respectivos con 10 ml de agua y transferirlos a la ampolla de decantación. Agregar 200 mg de clorhidrato de hidroxilamina, agitar e inmediatamente agregar 5,0 ml de *Solución de diaminonaftaleno* y mezclar. Dejar la solución a temperatura ambiente durante 100 minutos. Agregar 5,0 ml de ciclohexano, agitar vigorosamente durante 2 minutos y dejar que las fases se separen. Descartar la fase acuosa y centrifugar el extracto de ciclohexano para separar el agua dispersada. Determinar las absorbancias de los extractos de ciclohexano de la *Solución muestra* y la *Solución estándar de selenio* en celdas de 1 cm, a 380 nm con un espectrofotómetro, empleando como blanco el extracto de ciclohexano de la *Solución blanco*. Comparar las absorbancias. Si la cantidad de muestra a ensayar es de 200 mg, la absorbancia de la *Solución muestra* no debe ser mayor que la absorbancia de la *Solución estándar de selenio*. Si la cantidad de muestra a ensayar es de 100 mg, la absorbancia de la *Solución muestra* no debe ser mayor que la mitad de la absorbancia de la *Solución estándar de selenio.*

620. MATERIALES VOLUMÉTRICOS

La exactitud de los resultados analíticos depende de las características de los materiales volumétricos empleados. Estos materiales deben elegirse de manera de asegurar el grado de exactitud requerido.

La mayoría de los materiales volumétricos están calibrados a 20 °C, aunque la temperatura generalmente especificada en los ensayos y valoraciones farmacopeicas es 25 °C, esta diferencia es irrelevante si se considera que la temperatura ambiente del laboratorio se mantiene relativamente constante.

La calibración del material volumétrico se realiza de dos maneras diferentes: calibración por contenido (generalmente identificada como "In") y calibración por vertido (generalmente identificada como "Ex").

En los materiales volumétricos calibrados por contenido, la cantidad de líquido contenida corresponde exactamente al volumen indicado. Por el contrario, la cantidad de líquido vertida está reducida en la cantidad de líquido que permanece adherida a la pared del vidrio. En los materiales volumétricos calibrados por vertido, la cantidad de líquido vertida corresponde exactamente al volumen indicado, pues la cantidad de líquido que permanece adherida a la pared del vidrio se tuvo en cuenta al realizar la calibración.

El material volumétrico para laboratorio se clasifica en Clase A y Clase B de acuerdo al error máximo permitido. En general, el error máximo permitido para la Clase B es el doble del permitido para la Clase A. En esta Farmacopea se emplea material Clase A a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

Los errores máximos permitidos para matraces aforados, pipetas aforadas y buretas se indican en las *Tablas 1*, *2* y *3*.

Las pipetas graduadas y aforadas calibradas por vertido se desagotan en posición vertical y luego se completa el drenaje tocando la punta de la pipeta contra la pared del recipiente en el cual se transfiere el líquido. La lectura de volúmenes en buretas se estima a la división más cercana.

Las pipetas calibradas por contenido se emplean generalmente para medir líquidos viscosos. Este tipo de pipetas se puede reemplazar por un matraz aforado.

Tabla 1. Capacidad y errores máximos permitidos para matraces aforados.

Capacidad (ml)	Errores máximos permitidos	
	Clase A (ml)	Clase B (ml)
5	±0,025	±0,05
10	±0,025	±0,05
25	±0,04	±0,08
50	±0,06	±0,12
100	±0,10	±0,20
200	±0,15	±0,30
250	±0,15	±0,30
500	±0,25	±0,50
1.000	±,040	±0,80
2.000	±0,60	±1,20

Tabla 2. Capacidad y errores máximos permitidos para pipetas aforadas.

Capacidad (ml)	Capacidad y errores máximos permitidos para pipetas aforadas	
	Clase A (ml)	Clase B (ml)
0,5	±0,005	±0,01
1	±0,007	±0,015
2	±0,01	±0,02
5	±0,015	±0,03
10	±0,02	±0,04
20	±0,03	±0,06
25	±0,03	±0,06
50	±0,05	±0,10
100	±0,08	±0,16

Tabla 3. Capacidad y errores máximos permitidos para buretas.

Capacidad (ml)	Menor división de la escala (ml)	Errores máximos permitidos	
		Clase A (ml)	Clase B (ml)
5	0,02	±0,01	±0,02
10	0,02	±0,02	±0,05
10	0,05	±0,02	±0,05
25	0,05	±0,03	±0,05
25	0,1	±0,05	±0,1
50	0,1	±0,05	±0,1
100	0,2	±0,1	±0,2

625. MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA GASES MEDICINALES

DEFINICIONES

Gas blanco - Gas o mezcla de gases empleado para realizar el ajuste de cero en la calibración de los instrumentos analíticos.

Gas estándar - Gas o mezcla de gases empleado para realizar el ajuste de la escala en la calibración de los instrumentos analíticos.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Dióxido de Carbono SR-FA - CO_2 - (PM: 44,0) - [124-38-9] - Contiene no menos de 99,995 % v/v de CO_2, menos de 5 ppm de Monóxido de Carbono y menos de 25 ppm de Oxígeno.

Monóxido de Carbono SR-FA - CO - (PM: 28,0) - [630-08-0] - Contiene no menos de 99,97 % v/v de CO.

Monóxido de Nitrógeno SR-FA - NO - (PM: 30,0) - [10102-43-9] - Contiene no menos de 98,0% v/v de NO.

Nitrógeno SR-FA - N_2 - (PM: 28,01) - [7727-37-9] - Contiene no menos de 99,999 % v/v de N_2, menos de 0,5 ppm de Monóxido de Carbono y Dióxido de Carbono y menos de 5 ppm de Oxígeno.

Oxido Nitroso SR-FA - N_2O - (PM: 44,01) - [10024-97-2] - Contiene no menos de 99,99 % v/v de N_2O, menos de 1 ppm de Monóxido de Nitrógeno y menos de 1 ppm de Monóxido de Carbono.

Oxígeno SR-FA- O_2 - (PM: 32,00) - [7782-44-7] - Contiene no menos de 99,99 % v/v de O_2, menos de 100 ppm de Nitrógeno y Argón, menos de 10 ppm de Dióxido de Carbono y menos de 0,5 ppm de Monóxido de Carbono.

Mezcla que contenga 300 ppm v/v de Dióxido de Carbono SR-FA en Nitrógeno SR-FA - Se emplea para la determinación de Dióxido de Carbono en Oxígeno por analizador infrarrojo.

Mezcla que contenga 300 ppm v/v de Dióxido de Carbono SR-FA en Óxido Nitroso SR-FA - Se emplea para la determinación de Dióxido de Carbono en Óxido Nitroso por cromatografía de gases.

Mezcla que contenga 5 ppm v/v de Monóxido de Carbono SR-FA en Nitrógeno SR-FA - Se emplea para la determinación de Monóxido de Carbono en Oxígeno por analizador infrarrojo.

Mezcla que contenga 5 ppm v/v de Monóxido de Carbono SR-FA en Óxido Nitroso SR-FA - Se emplea para la determinación de Monóxido de Carbono en Óxido Nitroso por cromatografía de gases.

Mezcla que contenga 2 ppm de Monóxido de Nitrógeno SR-FA en Nitrógeno SR-FA- Se emplea para la determinación de Óxidos de Nitrógeno en Óxido Nitroso por quimioluminiscencia.

MÉTODOS DE ANALISIS

Analizador Paramagnético Para Oxígeno

Se emplea para determinar el contenido de oxígeno en gases medicinales.

El fundamento del método se basa en la propiedad que exhibe la molécula de oxígeno de ser fuertemente paramagnética. El oxígeno gaseoso se mide en base a la fuerza magnética que actúa sobre un cuerpo de prueba suspendido en un campo magnético no uniforme, cuando dicho cuerpo está rodeado por la muestra de gas. Dicha fuerza puede medirse electrónicamente y, una vez amplificada y transformada, proporciona la concentración de oxígeno en la muestra gaseosa.

La medida de la concentración de oxígeno es dependiente de la presión y de la temperatura. Por lo tanto, el analizador debe calibrarse antes del uso, si el instrumento no compensa automáticamente las variaciones de estos parámetros. El instrumento debe permitir determinar el nivel de oxígeno con una sensibilidad mínima de 0,1 %.

Calibración del instrumento -

Ajustar el cero de acuerdo a las instrucciones del fabricante, pasando Nitrógeno SR-FA a un caudal apropiado hasta obtener una lectura estable.

Ajustar la amplitud de la escala de acuerdo a las instrucciones del fabricante, pasando el gas estándar a un caudal adecuado hasta obtener una lectura estable. Utilizar aire estándar u oxígeno estándar, según corresponda.

Valoración -

Pasar el gas en ensayo en las mismas condiciones en las que fuera calibrado el instrumento hasta tener una lectura estable. Determinar el contenido de oxígeno en el gas en ensayo.

Higrómetro Electrolítico

Se emplea para determinar el contenido de vapor de agua en gases medicinales.

La celda electrolítica de medición está provista de dos electrodos de alambre de platino, en forma de espiral, entrelazados y aislados entre sí, recubiertos por una capa delgada de pentóxido de fósforo. El pentóxido de fósforo es altamente higroscópico y reacciona con el vapor de agua contenido en el gas en ensayo. A continuación, se aplica un voltaje continuo a través de los electrodos, lo que produce la electrólisis del agua y una regeneración del pentóxido de fósforo. Durante la electrólisis, se mide la corriente eléctrica que, de acuerdo con las leyes de Faraday, resulta proporcional al contenido de agua en el gas; no se re-

quiere entonces calibración contra estándar de humedad.

Analizador de Quimioluminiscencia

Se emplea para determinar el contenido total de monóxido de nitrógeno y dióxido de nitrógeno en gases medicinales.

El instrumento consta de los siguientes componentes:

- Un dispositivo para filtrar, controlar y regular el flujo del gas bajo análisis.
- Un convertidor que reduce el dióxido de nitrógeno a monóxido de nitrógeno, para determinar el contenido total de monóxido y dióxido de nitrógeno. La eficiencia del convertidor debe ser controlada antes de usar.
- Un generador de ozono de caudal controlado. El ozono se produce por descargas de corriente eléctrica de alto voltaje a través de dos electrodos. El generador de ozono se alimenta con oxígeno puro, o c on aire ambiental deshidratado. Para asegurar que la reacción se lleve a cabo en forma cuantitativa, la concentración de ozono debe ser muy superior de 2 ppm, máxima cantidad de óxidos de nitrógeno permitidos en la muestra.
- Una cámara de reacción de monóxido de nitrógeno y ozono.
- Un sistema para la detección de la luz emitida, consistente en un filtro óptico selectivo de 1,2 μm de longitud de onda y un tubo fotomultiplicador.

El gas bajo análisis ingresa a un caudal constante, previo paso por el filtro de partículas, en la cámara de reacción, donde se mezcla con un exceso de ozono. Allí se forma la especie excitada NO^* que, al decaer a su estado fundamental de energía, emite una radiación cuya intensidad es proporcional a la cantidad de monóxido de nitrógeno presente en la muestra. La energía luminosa se transforma en una señal eléctrica por medio de un sistema de filtro y fotomultiplicador.

El resultado obtenido debe multiplicarse por un factor de corrección debido al efecto de atenuación que causa la matriz de óxido nitroso en la señal luminiscente. Dicho factor se determina empleando una mezcla de referencia de monóxido de nitrógeno en óxido nitroso, comparando el contenido de la mezcla con la lectura indicada por el analizador.

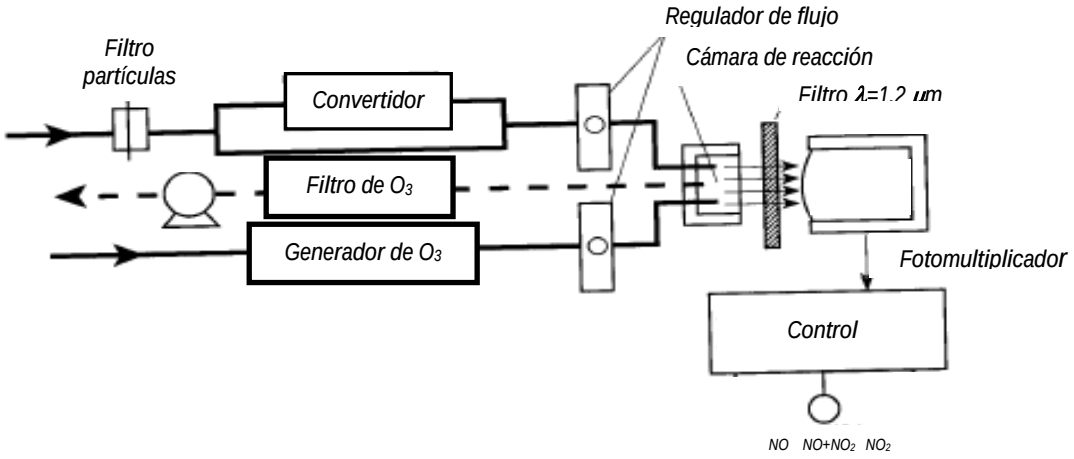


Figura 1. Analizador de Quimioluminiscencia

Analizador Infrarrojo

La fuente de radiación infrarroja posee un sistema para generar dos haces idénticos: uno atraviesa la celda por la que fluye el gas bajo análisis y el otro la celda de referencia, que contiene Nitrógeno SR-FA.

Este sistema de detección se basa en la medida de la diferencia de presión entre dos cámaras para gases, separadas por un diafragma metálico. Ambas cámaras contienen Dióxido de Carbono SR-FA o Monóxido de Carbono SR-FA, según se proceda al ensayo de uno u otro gas en la muestra.

La absorción de radiación infrarroja produce calor y consecuentemente un aumento de presión en las cámaras del detector. Debido a que la absorción de energía radiante por parte del Dióxido o Monóxido de Carbono contenido en la celda

de la muestra y del Nitrógeno contenido en la celda de referencia es distinta, la presión en ambas cámaras del detector será diferente. Esta diferencia de presión provoca la distensión del diafragma que las separa. El diafragma es parte de un capacitor, cuya capacitancia varía con la diferencia de presión, la que depende del contenido de dióxido de carbono o de monóxido de carbono en el gas en ensayo.

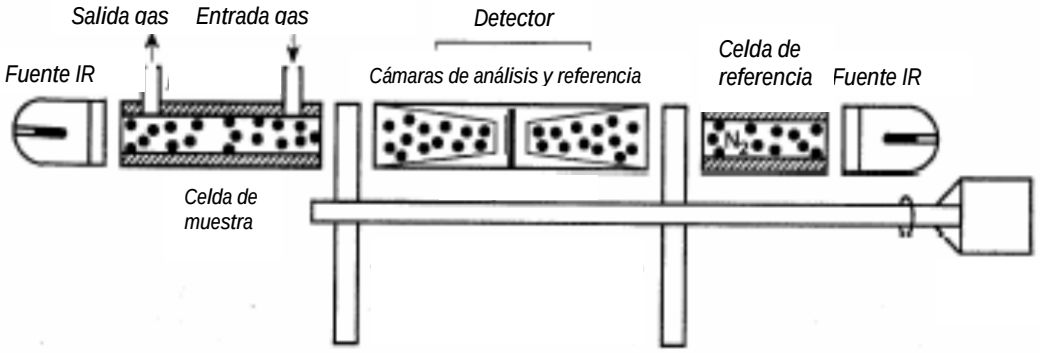


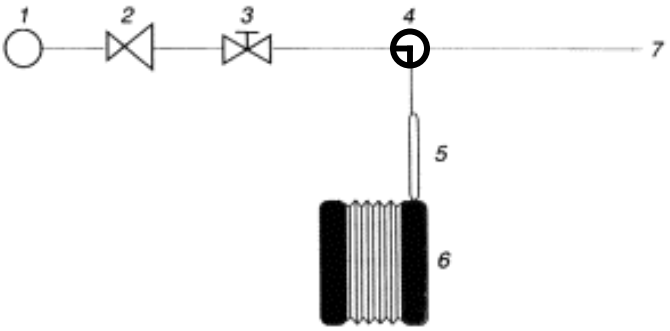
Figura 2. Analizador infrarrojo

Tubos Detectores de Gases

Son tubos cilíndricos, de diámetro interior constante, de vidrio u otro material inerte y transparente, cerrados herméticamente y construidos de modo de permitir el paso de los gases en ensayo. Cada tubo detector contiene una cantidad precisa de los reactivos apropiados, adsorbidos sobre sustratos inertes adecuados para la visualización directa de la sustancia a detectar. De ser necesario, también pueden contener capas previas a la reactiva y/o filtros adsorbentes, con el fin de eliminar las interferencias. La capa de indicador puede contener un único o bien varios reactivos para la detección de una o varias sustancias (tubos monocapa o multicapa). El ensayo se realiza haciendo pasar el volumen necesario del gas a analizar a través del tubo indicador. La longitud de la capa coloreada o la intensidad del cambio de color sobre una escala graduada da información sobre cantidad de sustancia presente.

La calibración de los tubos detectores se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Condiciones de funcionamiento - Proceder de acuerdo con las instrucciones del fabricante o empleando un dispositivo como el que se muestra en la figura siguiente:



1. **Envase de gas**
2. **Regulador de presión**
3. **Válvula de aguja**
4. **Llave de conmutación**
5. **Tubo detector**
6. **Bomba dosificadora**
7. **Extremo abierto atmósfera**

Figura 3

El envase que suministra el gas debe estar conectado a un regulador de presión adecuado y a una válvula de aguja. Conectar a la válvula aguja un tubo flexible provisto de una llave de conmutación. Purgar el sistema con la llave 4 en la posición de purga (7) y ajustar el flujo del gas bajo análisis a un valor apropiado.

Romper ambos extremos del tubo detector y conectar el tubo entre la bomba dosificadora y la válvula 4, siguiendo las instrucciones del fabricante. Operar la bomba 6 de manera de permitir el paso de un volumen adecuado del gas bajo análisis a través del tubo. Leer el valor correspondiente a la longitud de la capa coloreada o a la intensi-

dad del color sobre la escala graduada. Si el resultado obtenido es negativo, el tubo detector debe ser verificado con un gas de calibrado que contenga la sustancia a detectar.

La bomba dosificadora 6 puede reemplazarse eventualmente por un caudalímetro apropiado.

No utilizar el tubo detector para más de una determinación.

Tipos de tubos

Tubo detector de Aceite - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para el indicador ácido sulfúrico. El valor mínimo indicado es 0,1 mg/m^3 con una desviación estándar relativa máxima de ± 30 %.

[NOTA: debido a la gran diversidad de aceites para compresores, es necesario verificar la reactividad de los tubos detectores de aceites frente al aceite usado. La información sobre la reactividad de diversos aceites se da en el folleto suministrado con el tubo.]

*Tubo detector de Amoníac*o - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para el indicador azul de bromofenol. El valor mínimo indicado es 5 ppm con una desviación estándar relativa máxima de ± 10 %.

Tubo detector de Cloro - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para el indicador o-toluidina. El valor mínimo indicado es 0,5 ppm con una desviación estándar relativa máxima de ± 10 %.

Tubo detector de Dióxido de Azufre - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para los indicadores yodo y almidón. El valor mínimo indicado es 0,5 ppm con una desviación estándar relativa máxima de ± 15 %.

Tubo detector de Dióxido de Carbono - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para los indicadores hidrazina y violeta cristal. El valor mínimo indicado es 100 ppm con una desviación estándar relativa máxima de ± 15 %.

Tubo detector de Monóxido de Carbono - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para los indicadores pentóxido de iodo, dióxido de selenio y ácido sulfúrico fumante. El valor mínimo indicado es 2,5 ppm con una desviación estándar relativa máxima de ± 15 %.

Tubo detector para Monóxido y Dióxido de Nitrógeno - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para una capa oxidante de una sal de Cr (VI) y el indicador difenilbencidina. El valor mínimo indicado es 0,5 ppm con una desviación estándar relativa máxima de ± 15 %.

Tubo detector de Sulfuro de Hidrógeno - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para un indicador apropiado de sal de plomo. El valor mínimo indicado es 0,25 ppm con una desviación estándar relativa máxima de ± 10 %.

Tubo detector de Vapor de Agua - Contiene filtros adsorbentes y soportes adecuados para el indicador perclorato de magnesio. El valor mínimo indicado es 0,05 mg de vapor de agua por litro con una desviación estándar relativa máxima de ± 20 %.

630. MÉTODOS DE FARMACOGNOSIA

Ver *630. Métodos de Farmacognosia* en *Apartado de Fitoterápicos* en *Volumen III.*

635. MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS

Los métodos inmunoquímicos se basan en la unión específica, reversible y no covalente entre antígenos y anticuerpos. Estos métodos se emplean para detectar o cuantificar tanto antígenos como anticuerpos. La formación de un complejo antígeno-anticuerpo puede ser detectado y la cantidad del complejo formado puede ser medida por varias técnicas. Este método general se aplica a métodos inmunoquímicos que emplean, según el caso, reactivos marcados o no marcados.

Los resultados de los métodos inmunoquímicos dependen de las condiciones experimentales y de la naturaleza y calidad de los reactivos empleados. Es esencial estandarizar los componentes de un inmunoensayo y emplear, cuando se hallen disponibles, las Preparaciones Internacionales de Referencia para Inmunoensayos.

Los reactivos necesarios para numerosos métodos inmunoquímicos se hallan disponibles como kit comerciales, es decir, un conjunto que incluye los reactivos (especialmente el antígeno o el anticuerpo) y los materiales destinados al ensayo *in vitro* de una sustancia específica, así como las instrucciones para su correcto empleo. Los kits deben emplearse siguiendo las intrucciones del fabricante; es importante asegurarse que el kit es apropiado para el análisis de la preparación muestra, sobre todo en lo que se refiere a la especificidad y sensibilidad. Las recomendaciones relativas a los kits para inmunoensayos son establecidas por la Organización Mundial de la Salud, Serie de Informes Técnicos 658 (1981).

MÉTODOS EN LOS QUE SE EMPLEA UN ANTÍGENO MARCADO O UN ANTICUERPO MARCADO

Los métodos que emplean sustancias marcadas pueden emplear marcadores apropiados como enzimas, fluoróforos, luminóforos y radioisótopos. Cuando el marcador es un radioisótopo, el método se denomina radioinmunoensayo o ensayo de unión de radioligando. Las recomendaciones para la medida de la radiactividad que se hallan en *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas* son aplicables a los inmunoensayos que involucran radioisótopos. Todo trabajo que emplee materiales radiactivos debe realizarse de acuerdo con las normas regulatorias que rigen en la materia y las reglas de buenas prácticas internacionalmente aceptadas para la protección frente a los riesgos de radiación.

MÉTODOS EN LOS QUE SE EMPLEA UN ANTÍGENO O UN ANTICUERPO NO MARCADO

Métodos de inmunoprecipitación

Los métodos de inmunoprecipitación incluyen las reacciones de floculación y precipitación. Cuando se mezcla una solución de antígeno con su anticuerpo correspondiente, en las condiciones apropiadas, los reactivos forman agregados floculantes o precipitantes. La relación entre la cantidad de los reactivos que produce el menor tiempo de floculación o la precipitación más acentuada se denomina la relación óptima, generalmente se obtiene en presencia de cantidades equivalentes de antígeno y anticuerpo. La inmunoprecipitación puede detectarse por observación visual o determinarse mediante técnicas de dispersión de la luz (ensayos nefelométricos o turbidimétricos). Es posible lograr un incremento de la sensibilidad mediante el empleo, como soporte, de partículas (por ej. látex) recubiertas de antígeno o anticuerpo.

En los métodos de floculación se emplean diluciones sucesivas de uno de los reactivos, mientras que en los métodos de inmunodifusión (ID), se obtiene la dilución del reactivo por su difusión en un gel, se establecen gradientes de concentración de uno o de ambos reactivos, para crear zonas en el gel en las que la relación entre los reactivos favorece la precipitación. Los métodos de floculación se llevan a cabo en tubos de ensayo, mientras que los métodos de ID pueden realizarse empleando diferentes soportes como tubos, placas, portaobjetos, cubetas o cámaras.

La inmunoprecipitación se denomina *simple* cuando un solo antígeno se combina con su correspondiente anticuerpo; se denomina *compleja* cuando involucra reactivos relacionados pero no serológicamente idénticos y *múltiple* cuando intervienen varios reactivos no relacionados serológicamente.

En los *métodos de difusión simple* se establece un gradiente de concentración para uno solo de los reactivos que difunde desde una fuente externa al gel que contiene el reactivo correspondiente a una concentración relativamente baja.

La *inmunodifusión radial simple* (IDRS) es una técnica simple de inmunodifusión cuantitativa. Cuando se establece el equilibrio entre los reactivos externo e interno, el área de precipitación circular que se origina desde el punto de aplicación del reactivo externo, es directamente proporcional a la concentración del antígeno aplicado e inversamente

proporcional a la concentración de anticuerpo en el gel.

En los *métodos de doble difusión* se establecen gradientes de concentración para ambos reactivos. El antígeno y el anticuerpo difunden desde lugares separados en un gel inicialmente neutro desde el punto de vista inmunológico.

Los *métodos comparativos de difusión doble* se emplean para comparar, cualitativamente, diversos antígenos frente a un anticuerpo apropiado o viceversa. La comparación se basa en la presencia o ausencia de interacción entre las líneas de precipitación. Se pueden distinguir las reacciones de identidad, de no identidad o de identidad parcial de antígenos/anticuerpos.

Métodos inmunoelectroforéticos

La inmunoelectroforesis (IE) es una técnica cualitativa que combina dos métodos: la electroforesis en gel seguida de la inmunodifusión.

La *inmunoelectroforesis cruzada* es una modificación del método de IE, apropiada para ensayos cuali y cuantitativos. En una primera fase de la técnica, se lleva a cabo una electroforesis en gel clásica tras la cual la banda longitudinal del gel, que contiene las fracciones a ensayar, se corta y se transfiere a otra placa. Esta nueva placa se somete a una segunda electroforesis, en un ángulo de 90° respecto a la primera corrida electroforética, empleando un gel que contiene una concentración de anticuerpos comparativamente menor con respecto a los antígenos correspondientes. Para una concentración de anticuerpos y un espesor de gel determinados, la relación entre la respuesta de cada uno de los picos de precipitación y la cantidad del antígeno correspondiente es lineal.

El *electroinmunoensayo*, a menudo denominado rocket inmunoelectroforesis, es un método rápido cuantitativo para determinar antígenos con carga diferente de los anticuerpos o viceversa. La electroforesis del antígeno que va a ser analizado se lleva a cabo en un gel que contiene una concentración comparativamente menor del correspondiente anticuerpo. La preparación muestra y las diluciones del antígeno empleado como estándar se introducen en diferentes orificios del gel. Durante la electroforesis se forman arcos de precipitación de forma puntiaguda denominada "rockets" que migran desde los orificios. Cuando el antígeno ya no está en exceso el frente del precipitado detiene su avance. Para una concentración dada en anticuerpo, la relación entre la distancia recorrida por el precipitado y la cantidad de antígeno aplicada es lineal.

La *contrainmunoelectroforesis* es un método cuantitativo rápido que permite establecer gradientes de concentración de antígeno externo y anticuerpo externo en un campo eléctrico según sus diferentes cargas. Las diluciones de un estándar de calibración y las diluciones de la preparación muestra se introducen en una fila de orificios en el gel y en una fila de orificios opuesta a la primera se introduce una cantidad conocida del reactivo correspondiente. El título de la preparación muestra ensayada se puede considerar como la dilución más elevada que da lugar a línea de precipitación.

Existen diversas modificaciones de la *inmunoelectroforesis* cruzada y de los métodos de *electroinmunoensayo*.

Otras técnicas combinan la separación de los antígenos según su tamaño molecular y sus propiedades serológicas.

Visualización y caracterización de las líneas de inmunoprecipitación

Estas pueden realizarse mediante tinciones selectivas o no selectivas, por fluorescencia, mediante marcación enzimática e isotópica o por otras técnicas apropiadas. Los métodos de tinción selectiva son los empleados, habitualmente, para la caracterización de sustancias no proteicas en los precipitados.

En los geles traslúcidos, como los de agar o agarosa, la línea de precipitación es visible claramente, siempre que la concentración de cada uno de los reactivos sea la apropiada.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO

Criterios de validación

El método inmunoquímico cuantitativo solo es válido si:

1) El antígeno o anticuerpo no discrimina entre preparación muestra y estándar.

2) El método no se ve afectado por otros componentes de la preparación muestra o de sus excipientes, que pueden variar de una muestra a otra. Estos componentes pueden incluir concentraciones elevadas de otras proteínas, sales, conservantes o actividad proteolítica contaminante.

3) El límite de cuantificación es inferior al criterio de aceptación indicado en la monografía correspondiente.

4) La precisión de la valoración es tal que la varianza de los resultados corresponde a la exigencia establecida en la monografía correspondiente.

5) Hay ausencia de errores sistemáticos, ligados a la secuencia en la que se ha efectuado la determinación.

Métodos de validación

Para verirficar estos criterios, el método de validación debe respetar lo siguiente:

1) La valoración se realiza, al menos, por triplicado.

2) La valoración incluye, como mínimo, 3 diluciones diferentes de la preparación estándar y 3 diluciones diferentes de la preparación muestra que supuestamente presentan una actividad similar a la preparación estándar.

3) El diseño del ensayo es aleatorizado.

4) Si la preparación muestra es un suero o si está formulada con otros componentes, el estándar se prepara de la misma manera.

5) La valoración incluye la medida de la unión inespecífica del reactivo marcado.

6) Para los inmunoensayos con desplazamiento:

a) Se determina la unión máxima (desplazamiento cero).

b) Las diluciones cubren la gama completa de respuestas desde la unión máxima hasta valores cercanos a l a unión inespecífica, preferentemente tanto para la preparación muestra como para el estándar.

CÁLCULO ESTADÍSTICO

Para el análisis de resultados, las curvas de respuestas de la preparación muestra y la del estándar, pueden evaluarse según los métodos descriptos en *10. Análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos*.

Un no paralelismo significativo indica que el anticuerpo o el antígeno discrimina entre la preparación muestra y el estándar e implica que los resultados no son válidos.

En los inmunoensayos con desplazamiento, los valores de uniones inespecíficas y del máximo desplazamiento, a una concentración elevada de la preparación muestra o del estándar, no deben ser significativamente diferentes. Las diferencias podrían reflejar la interferencia debida al efecto matriz tanto por inhibición de la unión como por degradación del marcador.

640. OSMOLARIDAD Y OSMOLALIDAD

La concentración osmolar se expresa en osmoles de soluto por litro de solución, pero generalmente se emplea el submúltiplo miliosmoles (mosmol) de soluto por litro de solución. Idealmente, el peso de un osmol es el peso de la molécula gramo de una sustancia dividido por el número de iones o especies químicas osmóticamente activas (*n*) formados con la disolución. En soluciones ideales, por ejemplo, $n = 1$ para glucosa, $n = 2$ para cloruro de sodio o sulfato de magnesio, $n = 3$ para el cloruro de calcio y $n = 4$ para el citrato de sodio.

La concentración osmolar ideal puede determinarse por la fórmula siguiente:

$$\text{Conc. osmolar= mosmol} = (P/M)\, n\, 1.000$$

en la cual P es el peso de sustancia seca o anhidra según corresponda, en g por litro, y M es el peso molecular asignado, en gramos.

La concentración osmolal se expresa en osmol por kilogramo de solvente, pero el submúltiplo empleado generalmente es miliosmoles por kilogramo (mosmol/kg).

A medida que aumenta la concentración de soluto, aumenta la interacción entre las partículas disueltas y disminuye la osmolaridad real con respecto al valor ideal. La desviación de las condiciones ideales es generalmente pequeña en soluciones dentro del intervalo fisiológico. En soluciones de alta concentración, la osmolaridad real puede tener valores considerablemente inferiores a los ideales. Por ejemplo, la osmolaridad ideal de la *Solución Inyectable de Cloruro de Sodio* al 0,9 % es $9/58{,}4 \times 2 \times 1.000 = 308$ mosmol por litro. Sin embargo, *n* es algo menor que 2 para soluciones de cloruro de sodio a esta concentración y la osmolaridad medida real de la *Solución inyectable de cloruro de sodio* al 0,9 % es aproximadamente 286 mosmol por litro.

Procedimiento general

Cada osmol de soluto agregado a 1,0 kg de agua disminuye el punto de congelación en 1,858 °C y la presión de vapor baja aproximadamente 0,3 mm Hg (a 25 °C). Estos cambios físicos son cuantificables, lo que permite estimaciones exactas de las concentraciones osmolales. La relación existente entre la miliosmolalidad y el descenso crioscópico puede expresarse por la fórmula siguiente:

$$\text{Osmolalidad (mosmol/kg)} = (\Delta T/1{,}858)\ 1.000 \text{ mosmol/kg}$$

Cuando se emplean osmómetros que miden el descenso crioscópico, un volumen medido de solución (generalmente 2 ml) se coloca en un tubo de vidrio sumergido en un baño de temperatura controlada. Se coloca en la solución un termistor y un sistema de vibración y la temperatura del baño se reduce hasta lograr que la solución se sobreenfríe. El sistema de vibración se activa para inducir la cristalización del agua en la solución muestra y el calor de fusión liberado aumenta la temperatura de la mezcla hasta su punto de congelación. A través de un puente de Wheatstone, el puntó de congelación registrado se convierte en una medida de la osmolalidad. Para cada determinación, emplear un volumen constante de la solución en ensayo. El aparato se calibra empleando dos soluciones estándar de cloruro de sodio que abarcan el intervalo de osmolalidades esperado. Puede emplearse agua en lugar de una de las dos soluciones de referencia para calibrar el osmómetro. En todo caso, seguir las instrucciones del fabricante.

Cuando la presión osmótica de la muestra es mayor que 3000 mosmol, se debe diluir la muestra empleando un solvente apropiado, hasta llegar a un intervalo de mosmol-medible.

Preparación de las soluciones de referencia para la calibración del osmómetro

Pesar exactamente la cantidad de cloruro de sodio, previamente secado entre 500 y 650 °C durante 40 ó 50 minutos y enfriado en un desecador sobre sílica gel; que se indica en la *Tabla*. Disolver el cloruro de sodio en 100 g de agua, exactamente pesados, para cada solución de referencia.

Tabla. Soluciones de referencia para la calibración de osmómetros.

Osmolalidad real (mosmol/kg)	Peso de ClNa (g)	Descenso crioscópico (°C)	Presión osmótica KPa 0 °C	Presión osmótica KPa 38 °C
100	0,3087	0,186	227	259
200	0,6259	0,372	454	517
300	0,9463	0,558	681	776
400	1,2684	0,744	908	1.035
500	1,5916	0,930	1.136	1.294
600	1,9147	1,116	1.363	1.552
700	2,2380	1,302	1.590	1.811

650. PARTICULAS EN INYECTABLES

Las partículas presentes en las soluciones inyectables son sustancias extrañas móviles insolubles. Las soluciones inyectables, incluyendo las obtenidas por disolución de sólidos estériles, deben estar libres de partículas que puedan detectarse por inspección visual. La inspección visual, en condiciones estandarizadas, de la totalidad del lote producido se acepta para determinar la ausencia de partículas visibles en soluciones inyectables. Sin embargo, todos los inyectables de gran volumen y aquéllos de pequeño volumen, deben cumplir con los ensayos para la determinación de partículas subvisibles que se indican en este capítulo.

Los ensayos que se describen a continuación se emplean para contar las partículas extrañas subvisibles dentro de intervalos específicos de tamaño. Se describen dos procedimientos para la determinación de partículas en inyectables, uno de bloqueo de luz y otro microscópico. Las formulaciones inyectables son analizadas primero por el *Ensayo de recuento de partículas por bloqueo de luz*, si no cumplen con las especificaciones de este ensayo, se procede con el *Ensayo de recuento microscópico de partículas*. No todas las formulaciones inyectables pueden ser analizadas por medio de estos ensayos para determinar la presencia de partículas. Si el producto no es una solución, con transparencia y viscosidad similar a la del agua, pueden obtenerse datos erróneos al ser analizado por el método de recuento por bloqueo de luz. Dichos materiales pueden ser analizados por el método microscópico. En algunos casos, la viscosidad de un material puede ser tan elevada que imposibilite su análisis por los métodos descriptos. En dichos caso, puede realizarse una dilución cuantitativa con un diluyente apropiado para disminuir la viscosidad tanto como sea necesario, permitiendo de esta manera la realización del análisis.

En los ensayos que se describen a continuación, los resultados que se obtienen al analizar una cantidad discreta o un grupo de unidades para verificar la presencia de partículas, no se pueden extrapolar con certeza a otras unidades que no hayan sido ensayadas. Por lo tanto, deben desarrollarse planes de muestreo estadístico que se basen en factores operativos conocidos, si se desea obtener una referencia válida a partir de los datos observados para caracterizar el nivel de partículas en un grupo grande de unidades. Los planes de muestreo deberán tener en cuenta el volumen del producto, el número de partículas encontrado históricamente en el producto, en comparación con los límites, la distribución de tamaños de las partículas presentes y la variabilidad del recuento de partículas entre unidades.

Ensayo de recuento de partículas por bloqueo de luz

Este ensayo se aplica a inyectables de gran volumen, en cuyo rótulo se declara que contienen un volumen mayor o igual a 100 ml y a inyectables monodosis o multidosis de pequeño volumen, en cuyo rótulo se declara que contienen un volumen menor a 100 ml, ya sean soluciones o soluciones reconstituidas a partir de sólidos estériles, cuando se especifica expresamente en la monografía correspondiente.

Los inyectables en cuyo rótulo se declara que el producto se debe emplear con filtración están exentos de este requisito.

Aparato –

Es un sistema de recuento electrónico de partículas, que emplea un sensor de bloqueo de luz, provisto de un dispositivo apropiado para la introducción de muestras.

Los parámetros críticos a tener en cuenta en la elección de un equipo son los siguientes:

Límites de concentración del sensor - Emplear un aparato que posea un límite de concentración (máximo número de partículas por ml) que sea mayor que la concentración de partículas en la muestra que se va a someter a recuento. El límite de concentración de un sensor, certificado por el fabricante, se define como el nivel de recuento en el cual la coincidencia de pulsos debidos a la presencia simultánea de dos o más partículas en el intervalo de captación del sensor, representa menos del 10 % de los recuentos recogidos para partículas de 10 µm.

Intervalo dinámico del sensor – El intervalo dinámico del aparato empleado (intervalo de tamaños de partícula que se pueden medir y contar con precisión) debe incluir el tamaño más pequeño de partícula a determinar en los productos a ensayar.

Ambiente para el ensayo –

Los productos a ensayar se deben limpiar de tal modo que no introduzcan cantidades significativas de partículas que puedan modificar el resultado del ensayo. Las muestras, los materiales de vidrio, tapas y otros equipos empleados deben prepararse preferentemente en

un medio ambiente protegido por filtros de aire de alta eficiencia (HEPA). Durante la preparación de las muestras, se deben emplear guantes libres de polvo y vestimentas de las cuales no se desprendan partículas contaminantes. Limpiar los materiales de vidrio, tapas y cualquier otro elemento empleado, preferentemente sumergiéndolos en una solución de detergente no iónico. Enjuagar con agua corriente y luego enjuagar nuevamente con agua destilada o desionizada y filtrada. También pueden emplearse solventes orgánicos para facilitar la limpieza. [NOTA: en forma alternativa, se pueden emplear equipos exentos de partículas que resultan apropiados para estos ensayos]. Enjuagar el aparato con agua destilada o desionizada y filtrada, empleando una boquilla de mano a presión con un filtro en el extremo u otra fuente de agua filtrada, como por ejemplo agua destilada o desionizada pasada a través de un filtro de porosidad de 1,2 µm o menor.

Para obtener los recuentos del blanco, emplear un recipiente limpio del mismo tipo y volumen al empleado en el ensayo. Transferir un volumen de 50 ml de agua destilada o desionizada y filtrada al recipiente y agitar la muestra. Desgasificar mediante sonicación (entre 80 y 120 watts) durante aproximadamente 30 segundos o dejar reposar. Agitar para suspender las partículas. Retirar y obtener los recuentos de partícula para tres muestras consecutivas de no menos de 5 ml cada una, sin tener en cuenta el primer recuento. Si se observan más de diez partículas mayores o iguales a 10 µm de tamaño, o más de dos partículas mayores o iguales a 25 µm de tamaño en la muestra combinada de 10 ml, el ambiente no es apropiado para el análisis de partículas, pudiendo inferirse que el agua destilada o desionizada y filtrada, y los materiales de vidrio no han sido preparados apropiadamente, o bien el contador está generando recuentos espurios. En este caso, repetir los pasos preparatorios hasta que las condiciones de análisis sean apropiadas para el ensayo.

Preparación muestra –

Preparar las muestras a ensayar en la siguiente secuencia. Fuera del entorno del flujo laminar, retirar los cierres exteriores, precintos y cualquier rótulo adherido. Lavar exteriormente los envases con agua destilada o desionizada y filtrada según se describe en *Ambiente para el ensayo*. Proteger los envases de la contaminación ambiental hasta que se haya terminado el ensayo. Retirar el contenido de los envases de modo que se evite la posibilidad de generar partículas que puedan contaminar la muestra. Los envases con tapones desmontables pueden ensayarse directamente quitándoles la tapa. Asimismo, se pueden emplear dispositivos con agujas con las cuáles se penetran las tapas de las unidades. Los productos envasados en envases de plástico flexible pueden ensayarse haciendo un corte en el tubo de administración o cortando un vértice del envase.

Dependiendo de la forma farmacéutica, proceder según corresponda:

Preparaciones líquidas - El número de unidades a ensayar debe ser apropiado para proveer una evaluación estadísticamente válida de que un lote de producción u otro grupo grande de unidades, cumplan o excedan los límites establecidos. Las soluciones inyectables monodosis de pequeño volumen donde el volumen de cada unidad es menor a 25 ml pueden ensayarse combinando diez o más unidades. Para inyectables de gran volumen se deben ensayar unidades individuales. Para inyectables de gran volumen se deben ensayar unidades individuales. Para inyectables de gran volumen o inyectables de pequeño volumen donde el volumen de cada unidad es mayor o igual a 25 ml se pueden ensayar menos de diez unidades, en base a la definición de un plan de muestreo estadístico.

Contenido menor de 25 ml por cada unidad - Proceder según se indica en *Preparación muestra*. Mezclar y suspender las partículas en cada unidad invirtiendo veinte veces su contenido. [NOTA: debido al pequeño volumen de algunos productos, puede ser necesario agitar la solución vigorosamente para suspender las partículas completamente]. Abrir y combinar, en un envase limpio, el contenido de diez o más unidades para obtener un volumen no menor a 20 ml. Desgasificar la mezcla combinada mediante sonicación durante aproximadamente 30 segundos o dejar reposar hasta que la solución quede exenta de burbujas de aire. Agitar ligeramente, el contenido del envase teniendo cuidado de no introducir burbujas de aire o contaminación. Extraer no menos de tres alícuotas, cada una no menor de 5 ml y colocarlas en el sensor del sistema de recuento por bloqueo de luz. Descartar los datos de la primera porción.

Contenido de 25 ml o más por cada unidad - Proceder según se indica en *Preparación muestra*. Mezclar y suspender las partículas de cada unidad invirtiéndola veinte veces. Desgasificar la solución por sonicación durante aproximadamente 30 segundos o dejar reposar hasta que la misma quede exenta de burbujas de aire. Quitar el cierre, e insertar la sonda del contador en el centro de la solución. Agitar suavemente a mano el contenido de la unidad. Extraer no menos de tres alícuotas,

cada una no menor de 5 ml, y colocarlas en el sensor del sistema de recuento por bloqueo de luz. Descartar los datos de la primera porción.

Inyectables en envases multidosis - Proceder según se indica en *Contenido de 25 ml o más por cada unidad*. Calcular el resultado del ensayo en base al volumen de una alícuota que equivale a la dosis máxima declarada en el rótulo; por ej., si el volumen total del envase es 50 ml y el volumen de la dosis máxima es 10 ml, el promedio del recuento de partículas por bloqueo de luz por ml se multiplica por 10 para obtener el resultado del ensayo en base a la dosis máxima de 10 ml. [NOTA: para los cálculos siguientes, considerar que el volumen de dosis máxima es equivalente al contenido del envase total].

Polvos y liofilizados - Proceder según se indica en *Preparación muestra*. Los polvos y liofilizados, se pueden reconstituir, ya sea quitando la tapa para agregar el diluyente o inyectando el diluyente mediante una jeringa hipodérmica que posee un filtro de 1,2 µm o más fino, teniendo cuidado de no contaminar el contenido o la tapa. Si las muestras se combinan, quitar la tapa y vaciar el contenido de cada uno en un envase limpio. Colocar el cierre y agitar el envase para disolver la muestra. [NOTA: para ciertos productos puede ser necesario dejar en reposo las unidades durante un intervalo apropiado y luego agitar nuevamente hasta que la muestra se disuelva completamente]. Después que la muestra se haya disuelto completamente, mezclar y suspender las partículas presentes de cada unidad invirtiendo veinte veces su contenido antes del ensayo. Proceder según se indica para el volumen apropiado de la unidad en *Preparaciones líquidas* y analizar extrayendo no menos de tres alícuotas, cada una no menor de 5 ml, y colocarlas en el sensor del sistema de recuento por bloqueo de luz. Descartar los datos de la primera alícuota.

Cálculos -

Muestras combinadas (inyectables de pequeño volumen) - Promediar los recuentos de dos o más alícuotas analizadas. Calcular el número de partículas en cada envase por la fórmula siguiente:

$$\frac{PV_t}{V_a n}$$

en la cual P es el recuento de partículas promedio obtenido a partir de las porciones analizadas, V_t es el volumen de mezcla combinada, en ml, V_a es el volumen de cada porción analizada, en ml, y n es el número de unidades mezcladas.

Muestras individuales (inyectables de pequeño volumen) - Promediar los recuentos obtenidos para las porciones de las alícuotas de 5 ml o mayores de cada unidad analizada y calcular el número de partículas en cada unidad por la fórmula siguiente:

$$\frac{PV}{V_a}$$

en la cual P es el recuento de partículas promedio obtenido a partir de las porciones ensayadas, V es el volumen, en ml, de la unidad ensayada y V_a es el volumen, en ml, de cada porción analizada.

Muestras de unidades individuales (inyectables de gran volumen) - Promediar los recuentos obtenidos para dos o más alícuotas de 5 ml tomadas de la muestra. Calcular el número de partículas en cada mililitro del inyectable analizado por la fórmula siguiente:

$$\frac{P}{V}$$

en la cual P es el recuento de partículas promedio para una muestra individual de 5 ml o de mayor volumen y V es el volumen, en ml, de la porción tomada.

Interpretación -

El inyectable cumple con los requisitos del ensayo si el número promedio de partículas presentes en las unidades ensayadas no es mayor al valor indicado en la *Tabla 1*.

Tabla 1. Límite máximo de partículas por bloqueo de luz.

	≥ 10 µm	≥ 25 µm
Inyectables de pequeño volumen	6.000 por unidad	600 por unidad
Inyectables de gran volumen	25 por unidad	3 por ml

Ensayo de recuento microscópico de partículas

El ensayo de recuento microscópico de partículas puede aplicarse tanto a inyectables de gran volumen como de pequeño volumen. Este ensayo cuenta las partículas sólidas subvisibles presentes, después de la recolección de las mismas sobre una membrana filtrante. Al realizar este ensayo, no se deben considerar los materiales

amorfos, semilíquidos o a quellos que presenten una mancha o decoloración sobre la superficie de la membrana. Estos materiales muestran poco o ningún relieve en su superficie y presentan un aspecto gelatinoso o similar al de una película.

Aparatos -

Microscopio - Emplear un microscopio binocular. La combinación de lentes del objetivo y el ocular debe dar una magnificación de 100 ± 10x. El objetivo debe ser de 10x de magnificación nominal, acromático planar o de mejor calidad, con una abertura numérica mínima de 0,25. Los oculares deben poseer una magnificación de 10x. Además, el ocular debe ser diseñado para aceptar y enfocar en un ocular reticulado. El microscopio debe tener una platina mecánica capaz de sostener y recorrer en su totalidad el área de una membrana filtrante de 25 ó 47 mm de diámetro.

Iluminadores - Se requieren dos iluminadores. Uno es un iluminador auxiliar externo, de foco regulable para iluminar en dirección oblicua con un ángulo de 10° a 20°. El otro es un iluminador episcópico interno de campo brillante. Ambos iluminadores deben ser de una potencia suficiente para proporcionar una fuente de iluminación brillante y pareja, pueden estar equipados con filtros de color azul para reducir la fatiga del operador durante su empleo.

Retículo para la medición del diámetro de partículas - Emplear un ocular reticulado circular (ver *Figura*) apropiado para el modelo de objetivo y ocular del microscopio en que los círculos de clasificación por tamaño estén dentro de 2 % del tamaño establecido en el plano de la platina del aparato.

Según se puede observar en la *Figura*, el círculo grande está fraccionado por filamentos en cuadrantes que determinan el campo reticular (CR). Los círculos transparentes, de color negro, con diámetros de 10 y 25 µm en 100x se proporcionan como escalas de comparación para clasificar las partículas por tamaño.

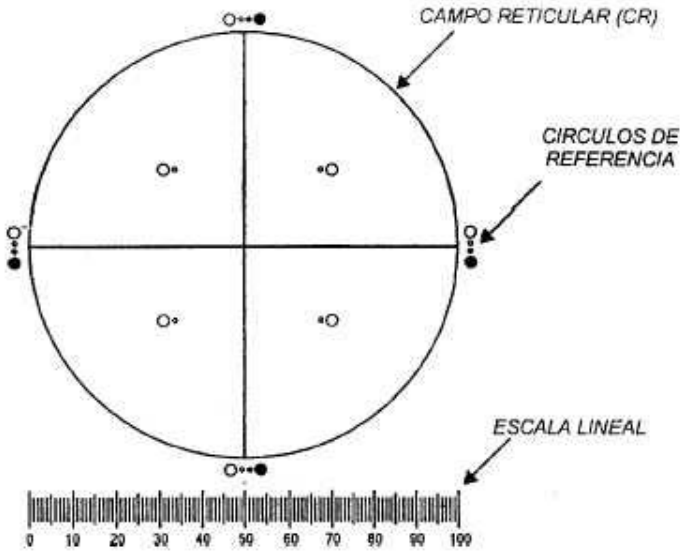


Figura.

Micrómetro - Emplear un micrómetro de platina certificado, con graduaciones de 10 µm.

Aparatos de filtración - Emplear un embudo filtrante apropiado para el volumen a ensayar, con un diámetro mínimo de aproximadamente 21 mm. El embudo debe ser de plástico, vidrio acero inoxidable. Colocar el filtro sobre una criba de acero inoxidable o una placa de vidrio sinterizado para que actúe como difusor del filtrado. El aparato de filtración está equipado con una fuente de vacío, un dispensador de solvente capaz de entregar solvente filtrado a través de un filtro 1,2 µm o por osidad menor en un intervalo de presiones de 10 a 80 psi y membranas filtrantes (de 25 ó 47 mm, reticuladas o no, de color negro o gris oscuro, de un material apropiado compatible con el producto, de 1,0 µm o porosidad menor). Emplear pinzas de punta roma para manipular los filtros de membrana.

Ambiente para el ensayo -

Una campana de flujo laminar u otro recinto - con flujo de aire laminar, con una capacidad suficiente para separar el área donde se lleva a

cabo el análisis, con aire filtrado a través de un filtro HEPA no habiendo más de 3.500 partículas (mayores o iguales a 0 ,5 µm) por metro cúbico. Para la determinación del blanco, medir con el dispensador un volumen de 50 ml de agua destilada o desionizada y filtrada. Aplicar vacío y pasar el volumen total de agua a través del filtro de membrana. Retirar la membrana de la base del embudo y colocarla sobre una cinta con adhesivo en ambas caras, en un portaobjetos o una placa de Petri. Dejar secar la membrana, examinarla microscópicamente a una magnificación de 100x. Si no más de 20 partículas mayores o iguales a 10 µm y 5 partículas mayores o iguales a 25 µm están presentes dentro del área de filtración, el nivel de partículas es apropiado para llevar a cabo el ensayo.

Durante todo este procedimiento, se deben emplear guantes apropiados libres de polvo, materiales de vidrio y equipos completamente limpios. Antes de realizar el ensayo limpiar todas las superficies del área de flujo laminar con un solvente apropiado. El material de vidrio y los equipos deben haber sido enjuagados sucesivamente con una solución de detergente libre de residuos a aproximadamente a 1 00 °C, agua caliente, agua destilada o desionizada y alcohol isopropílico. [NOTA: el agua destilada o desionizada y el alcohol isopropílico se deben filtrar empleando filtros de 1,2 µm o por osidad menor]. Hacer los enjuagues bajo un flujo laminar equipado con filtros HEPA. Dejar secar los materiales de vidrio y los aparatos de filtración bajo la campana. Preferentemente, la campana debe estar ubicada en una habitación separada, provista con aire filtrado y acondicionado, mantenida bajo presión positiva.

Preparación del microscopio –

Colocar el iluminador auxiliar cerca de la platina, enfocar el iluminador para dar un área concentrada de iluminación sobre una membrana filtrante colocada en la platina. Ajustar la altura del iluminador para que el ángulo de incidencia de la luz sea 10° ó 20° con respecto a la horizontal. Empleando el iluminador episcópico interno, abrir totalmente el campo y la abertura de los diafragmas. Centrar el filamento de la lámpara y enfocar el microscopio en un filtro que contenga partículas. Ajustar la intensidad de iluminación reflejada hasta que las partículas sean claramente visibles y muestren sombras pronunciadas. Ajustar la intensidad de iluminación episcópica al grado más bajo y luego aumentar la hasta que las sombras producidas por las partículas muestren la disminución menos perceptible de contraste.

Operación del retículo para la medición del diámetro de partículas -

El error relativo del retículo empleado debe medirse inicialmente con un micrómetro de platina certificado. Para realizar esto, alinear la escala micrométrica del retículo con la del micrómetro de la platina para que queden paralelas. [NOTA: comparar las escalas, empleando el mayor número posible de graduaciones]. Leer el número de divisiones de la escala del ocular reticulado, DEOR, comparado con las divisiones del micrómetro de la platina, DMP. Calcular el error relativo por la fórmula siguiente:

$$100\left[\frac{(DEOR - DMP)}{DMP}\right]$$

Un error relativo de ± 2 % es aceptable. La técnica básica de medición aplicada con el empleo del retículo para la medición del tamaño de partículas consiste en transformar mentalmente la imagen de cada partícula en un círculo y luego compararlo con los círculos de referencia del retículo de 10 y 25 µm. El proceso de medición por tamaño se lleva a cabo sin superponer la partícula en los círculos de referencia; las partículas no deben moverse de sus localizaciones dentro del campo del retículo (el círculo grande) para compararlas con los círculos de referencia. Emplear el diámetro interno de los círculos claros de referencia del retículo para clasificar por tamaño a las partículas blancas y transparentes. Emplear el diámetro exterior de los círculos de referencia de color negro del retículo para clasificar por tamaño a las partículas oscuras.

Rotar el retículo en el ocular derecho del microscopio para que la escala lineal quede ubicada en la parte inferior del campo; enfocando rápida y definidamente el retículo mediante el ajuste del anillo derecho de la dioptra del ocular mientras se observa la muestra fuera de foco. Enfocar el microscopio sobre la muestra, mirando solamente a través del ocular derecho. Luego, mirando a través del ocular izquierdo, ajustar la dioptra del ocular izquierdo para enfocar con definición.

Preparación del aparato de filtración –

Lavar preferentemente todos los componentes del aparato de filtración en una solución de detergente líquido y agua caliente. Enjuagar con agua caliente. Aplicar un segundo enjuague con agua destilada o desionizada y filtrada, empleando agua a presión sobre todas las superficies exteriores e interiores del aparato de filtración. Repetir el procedimiento del enjuague a presión

empleando alcohol isopropílico filtrado. Finalmente, empleando el dispositivo de enjuague a presión, enjuagar el aparato con agua destilada o desionizada y filtrada.

Retirar una membrana filtrante de su envase empleando una pinza limpia de punta roma. Emplear agua destilada o desionizada y filtrada para lavar ambos lados del filtro. Armar el aparato de filtración con el difusor en la base y colocar el filtro sobre el difusor. Colocar el embudo en la parte superior de la base y fijarlo en su lugar.

Preparación muestra –

Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Recuento de partículas por bloqueo de luz.*

Preparaciones líquidas - Para inyectables de pequeño volumen con un volumen mayor o igual a 25 ml, ensayados individualmente, y para inyectables de gran volumen, se debe realizar el ensayo sobre todo el volumen de la unidad. Para inyectables de gran volumen o i nyectables de pequeño volumen donde el volumen de cada unidad es mayor o igual a 25 ml se deben ensayar menos de diez unidades seleccionadas en base a la definición de un plan de muestreo estadístico. Mezclar y suspender las partículas en cada unidad invirtiendo veinte veces su contenido. Abrir las unidades de manera de generar el menor número posible de partículas. Para productos con un volumen menor a 25 ml, abrir y combinar el contenido de diez o más unidades en un envase limpio. Filtrar las unidades de gran volumen en forma individual. Se pueden filtrar individualmente las unidades de pequeño volumen mayor o igual a 25 ml.

Mediante el empleo del embudo de filtración transferir el volumen total de una solución combinada o una unidad individual y aplicar vacío. Si se va a em plear el procedimiento de recuento parcial (ver *Procedimiento de recuento parcial* en *Recuento de Partículas*), no dejar que el volumen del líquido en el embudo filtrante se encuentre por debajo de la mitad del volumen del embudo entre cada uno de los llenados. [NOTA: emplear un embudo filtrante apropiado al volumen de la solución si se va emplear el procedimiento de recuento parcial. Esto es necesario para asegurar la distribución pareja de las partículas sobre la membrana]. Después de agregar la última porción de la solución, comenzar a lavar las paredes del embudo filtrante aplicando en forma circular agua destilada o desionizada y filtrada y dejar de lavar antes que el volumen llegue por debajo de un cuarto del nivel de llenado. Mantener el vacío hasta haber filtrado todo el líquido. Retirar el embudo filtrante de la base mientras se mantiene el vacío, cerrar el vacío y retirar la membrana con una pinza de punta roma. Colocar la membrana sobre una placa de Petri u otro envase similar, fijarla con una cinta con adhesivo en ambas caras e identificar la muestra. Dejar que el filtro se seque al aire en el recinto de flujo laminar dejando la tapa del envase semiabierta.

Polvos y liofilizados - Proceder según se indica en *Preparación muestra* en *Recuento de partículas por bloqueo de luz*. Empleando una solución combinada de diez unidades o más o el número requerido de unidades individuales, proceder según se indica en *Preparaciones líquidas.*

Inyectables en envases multidosis - Proceder según se indica en *Preparaciones líquidas*, filtrando el volumen total de la unidad. Calcular el resultado del ensayo referido al volumen de una porción equivalente a la dosis máxima declarada en el rótulo. Considerar que esta porción es el equivalente al contenido del envase total. Por ejemplo, si el volumen total del envase es 50 ml y el volumen de la dosis máxima es 10 ml, el resultado del ensayo de recuento del volumen total se multiplicará por 0,1 para obtener el resultado del ensayo en base a la dosis máxima de 10 ml. [NOTA: para los cálculos, considerar que esta porción es el equivalente al contenido de un envase lleno].

Recuento de partículas -

El ensayo microscópico descrito en esta sección es flexible con respecto al modo de recuento, ya que permite contar partículas por ml, en muestras que contengan 1 partícula por ml así como en muestras que contengan un número significativamente mayor de partículas por ml. Este método puede emplearse cuando se cuentan todas las partículas en la superficie de la membrana de análisis o cuando solamente se cuentan aquellas partículas en un área fraccionada de la superficie de la membrana.

Procedimiento de recuento total -

En un recuento total, se ignora el campo reticular (CR) definido por el círculo grande del retículo y se emplea el filamento vertical. Barrer la membrana totalmente de derecha a izquierda en un camino que colinda, pero no se superponga, con el primer camino de barrido. Repetir este procedimiento, moviéndose de izquierda a derecha, y nuevamente a la izquierda, hasta que todas las partículas de la membrana hayan sido contadas. Registrar el número total de partículas mayores o iguales a 10 µm y mayores o iguales a

25 µm. Para inyectables de gran volumen, calcular el número de partículas, por ml, para la unidad ensayada, por la fórmula siguiente:

$$\frac{P}{V}$$

en la cual P es el número total de partículas contadas y V es el volumen de la solución, en ml. Para inyectables de pequeño volumen, calcular el número de partículas, por unidad, por la fórmula siguiente:

$$\frac{P}{n}$$

en la cual P es el número total de partículas contadas y n es el número de unidades combinadas.

Procedimiento de recuento parcial -

Si se realizara un recuento parcial de partículas sobre una membrana, el operador debe, en primer lugar, asegurarse de que se realice una distribución homogénea de partículas en la membrana. Esto es evaluado barriendo rápidamente para buscar agregados de partículas. No debe observarse ningún agregado. Contar las partículas mayores o iguales a 10 µm en el CR en el borde del área de filtración así como en el centro de la membrana. El número de partículas mayores o iguales a 10 µm en el CR con el recuento total más alto de partículas no es más del doble del CR con el recuento más bajo de partículas. Rechazar un filtro que no cumpla estos criterios y preparar otro si se emplea un procedimiento de recuento parcial, o analizar esta membrana por el método de recuento total.

El número normal de CR contados para un recuento parcial es 20. Si se desea un intervalo de confianza más pequeño con respecto al resultado, puede contarse un número de campos y partículas mayor. Contar todas las partículas que tengan un diámetro mayor o igual a 10 µm y mayor o igual a 25 µm dentro del CR y aquéllas que están en contacto con el lado derecho del círculo del CR. No contar las partículas fuera del CR. Ignorar aquéllas que tocan el lado izquierdo del círculo de CR. La línea divisoria entre el lado derecho y el izquierdo del círculo del CR es el filamento vertical. [NOTA: determinar el tamaño de la partícula sin cambiar el aumento o la iluminación del microscopio].

Para realizar un recuento parcial de partículas sobre una membrana, comenzar en el borde derecho del centro del área de filtración y empezar a contar los CR adyacentes. Cuando se llega al borde izquierdo del área de filtración, mover a un CR hacia la parte superior del filtro y continuar contando los CR avanzando en la dirección opuesta. El movimiento de un CR al próximo puede ser realizado por dos métodos. Un método es definir un punto de referencia (partícula o irregularidad de la superficie del filtro) y mover un CR en relación al punto. Un segundo método es emplear el vernier de la platina del microscopio para mover 1 mm entre los CR. Para facilitar esto último, ajustar la posición de los controles x e y en la platina del microscopio a un número entero en la posición inicial en el centro del borde derecho del área dé filtración; luego cada CR será una división entera de movimiento del control x de la posición de la platina. Si se llega a la parte superior del área de filtración antes de obtener el número deseado de CR se empieza nuevamente en el centro del borde derecho del área de filtración un CR por debajo del empleado la primera vez. Esta vez moverse hacia abajo en la membrana cuando se llega al final de una fila de los CR. Continuar como antes hasta completar el número de CR.

Para inyectables de gran volumen, si se emplea un procedimiento de recuento parcial para los intervalos de tamaño 10 y 25 µm, calcular las partículas por ml, por la fórmula siguiente:

$$\frac{PA_t}{A_pV}$$

en la cual P es el número de partículas contadas, A_t es el área de filtración de la membrana en mm^2, A_p es el área parcial contada en mm^2, en base al número de campos reticulares contados y V es el Volumen de solución filtrada, en ml. Para una solución combinada (para unidades de inyectables de pequeño volumen que contengan menos de 25 ml) o para una sola unidad de un inyectable de pequeño volumen, calcular el número de partículas por unidad, por la fórmula siguiente:

$$\frac{PA_t}{A_pn}$$

en la cual n es el número de unidades contadas y los otros términos son los definidos anteriormente. Para todos los tipos de productos, si el material ensayado ha sido diluido para que disminuya la viscosidad, el factor de dilución debe tomarse en cuenta al calcular el resultado final del ensayo.

Interpretación –

El inyectable cumple con los requisitos del ensayo si el número de partículas promedio presente en

las unidades ensayadas no excede los valores enumerados en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Límite máximo de partículas por recuento microscópico.

	≥ 10 µm	≥ 25 µm
Inyectables de pequeño volumen	3.000 por unidad	300 por unidad
Inyectables de gran volumen	12 por ml	2 por ml

660. PARTÍCULAS METÁLICAS EN UNGÜENTOS OFTÁLMICOS

El siguiente ensayo está diseñado para establecer que el número y tamaño de partículas metálicas que pueden estar presentes en ungüentos oftálmicos no superen el límite aceptado.

Procedimiento - Dispersar el contenido de diez unidades en sendas placas de Petri de 60 mm de fondo plano. Cubrir las placas y calentarlas a 85 °C durante 2 horas o hasta fundir el producto. Dejar reposar cada una de las placas a t emperatura ambiente hasta que las muestras solidifiquen.

Retirar las tapas e invertir cada placa de Petri en la platina de un microscopio ajustado a 30x y equipado con un ocular con micrómetro calibrado. Además de la fuente de luz usual, dirigir otra fuente de iluminación a la parte superior de la placa en un ángulo de 45°. Examinar las placas de Petri en su totalidad para detectar la eventual presencia de partículas metálicas, que al variar la intensidad de la fuente de iluminación superior se reconocen por su brillo característico.

Contar el número de partículas metálicas mayores o iguales a 50 µm: el producto cumple con los requisitos si el número total de partículas en las diez unidades no es mayor de 50 y si no más de una unidad contiene más de 8 partículas metálicas. Si no se obtienen estos resultados, repetir el ensayo con veinte unidades adicionales: el producto cumple si el número total de partículas metálicas mayores o iguales a 50 µm no es mayor de 150 en las treinta unidades ensayadas y si no más de tres unidades contienen más de 8 partículas cada una.

670. PÉRDIDA POR CALCINACIÓN

Este procedimiento se emplea para determinar el porcentaje de material en ensayo que se volatiliza y elimina bajo las condiciones especificadas.

Llevar a cabo el ensayo sobre el material finamente pulverizado. Pesar la muestra sin tratamiento adicional, a menos que en la monografía correspondiente se especifique un secado preliminar a temperatura inferior u otro tratamiento previo. Calcinar en una mufla empleando un crisol apropiado con tapa, previamente sometido 1 hora a la temperatura especificada para el ensayo, enfriado en un desecador y pesado, a menos que se especifique otro equipo en la monografía correspondiente. Transferir al crisol, previamente pesado, una cantidad exactamente pesada de la muestra, expresada en g, aproximadamente igual a la calculada por la fórmula siguiente:

$$10/L$$

en la cual L es el límite (o el valor medio de los límites), en porcentaje, para *Pérdida por calcinación* en la monografía correspondiente. Calcinar el crisol cargado, sin su tapa, y cubrirlo cuando se haya alcanzado la temperatura especificada (±25 °C). Continuar la calcinación durante el período designado en la monografía correspondiente. Cuando se especifique calcinación hasta peso constante, calcinar durante períodos sucesivos de 1 hora. Al finalizar cada período, cubrir el crisol y dejarlo enfriar en un desecador a temperatura ambiente antes de pesar.

680. PERDIDA POR SECADO

El procedimiento establecido en este ensayo se emplea para determinar la cantidad de materia volátil de cualquier naturaleza que se elimina bajo las condiciones especificadas. Para las sustancias que únicamente contienen agua como constituyente volátil, proceder según se indica en *<120>. Determinación de agua*.

Homogeneizar y pesar exactamente la muestra y, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, llevar a cabo la determinación sobre 1 a 2 g de la misma. Pesar un pesafiltro previamente secado durante 30 minutos y colocar la muestra en el mismo. Distribuir la muestra lo más uniformemente posible, agitando suavemente el pesafiltro de modo que se forme una capa de 5 mm de espesor aproximadamente y no más de 10 mm en el caso de materiales voluminosos. Tapar y colocar el pesafiltro en la cámara de secado. Secar la muestra a la temperatura y durante el tiempo especificado en la monografía correspondiente. [NOTA: la temperatura especificada en la monografía se considerará dentro del intervalo de ± 2 °C del valor establecido]. Abrir la cámara, tapar el pesafiltro rápidamente y llevarlo a temperatura ambiente en un desecador antes de pesar.

Para muestras que fundan a una temperatura inferior a la especificada para la determinación de *Pérdida por secado*, mantener el pesafiltro con su contenido durante 1 ó 2 horas a una temperatura 5 a 10 °C por debajo de la temperatura de fusión y luego secar a la temperatura especificada.

Para muestras contenidas en cápsulas, emplear el contenido de no menos de cuatro unidades. Si son comprimidos, emplear una muestra del polvo obtenido a partir de no menos de cuatro unidades finamente pulverizadas.

Si la monografía correspondiente establece:

a) pérdida por secado mediante análisis termogravimétrico, emplear una termobalanza.

b) secado al vacío sobre un desecante o secado en un desecador, emplear un desecador de vacío, una pistola de secado al vacío u otro aparato apropiado de secado al vacío, teniendo las precauciones necesarias para asegurar que el desecante se mantenga activo reemplazándolo frecuentemente.

c) secado en un pesafiltro con tapa provista de un capilar, emplear un pesafiltro o tubo equipado con una tapa provista de un capilar de un diámetro de 225 ± 25 µm y mantener la cámara de calentamiento a una presión de 5 mm Hg o menor. El pesafiltro debe permanecer tapado durante toda la determinación. Al finalizar el período de calentamiento, llenar la cámara de calentamiento con aire seco, retirar el pesafiltro y con la tapa colocada dejarlo enfriar en un desecador antes de pesar.

690. PESAS Y BALANZAS

Los ensayos y valoraciones farmacopeicas requieren balanzas (ya sean mecánicas o electrónicas) de diferente capacidad, sensibilidad y reproducibilidad. Estas balanzas se encuentran comprendidas en dos grandes grupos: balanzas analíticas y balanzas de precisión, las cuales difieren en sensibilidad y alcance máximo de pesada, siendo este último flexible.

	Sensibilidad		Capacidad máxima
	Desde	Hasta	Hasta
Balanzas analíticas	1 μg	0,1 mg	500 g
Balanzas de precisión	1 mg	0,1 g	5.000 g

A menos que se especifique de otro modo, cuando las sustancias deban ser exactamente pesadas debe emplearse un i nstrumento cuyo grado de incertidumbre (error aleatorio más error sistemático) no sea mayor de 0,1 % de la lectura.

La incertidumbre en la medida es aceptable si tres veces el valor de la desviación estándar, de no menos de diez pesadas, dividido por la cantidad pesada, no es mayor de 0,001.

Para balanzas electrónicas exclusivamente, debe determinarse la mínima cantidad de sustancia a pesar por la fórmula siguiente:

$$m(mg) = 3\sigma_{n-1}(mg)1.000$$

El valor de σ_{n-1} debe obtenerse experimentalmente para cada balanza (realizando no menos de diez pesadas) y es independiente de la cantidad pesada, pero sí depende de la instalación, del manipuleo, de la variación de las condiciones ambientales y también del material del recipiente de pesada.

Para la calibración de balanzas analíticas deben emplearse pesas Clase E_2 y para balanzas de precisión pesas Clase E_2 o Clase F_1.

Las pesas deben estar acompañadas de sus correspondientes certificados de calibración. Las tolerancias para ambas Clases han sido establecidas por la Organización Internacional de Metrología Legal (OIML).

Valor nominal	Clase E_2	Clase F_1
	Tolerancia en ± mg	Tolerancia en ± mg
1 mg	0,006	0,020
2 mg	0,006	0,020
5 mg	0,006	0,020
10 mg	0,008	0,025
20 mg	0,010	0,030
50 mg	0,012	0,040
100 mg	0,015	0,050
200 mg	0,020	0,060
500 mg	0,025	0,080
1 g	0,030	0,10
2 g	0,040	0,12
5 g	0,050	0,15
10 g	0,060	0,20
20 g	0,080	0,25
50 g	0,10	0,30
100 g	0,15	0,5
200 g	0,30	1,0
500 g	0,75	2,5
1 kg	1,5	5
2 kg	3,0	10

Tabla – continuación.

Valor nominal	Calse E_2 Tolerancia en ± mg	Clase F_2 Tolerancia en ± mg
5 kg	7,5	25

Estas pesas deben recalibrarse periódicamente por comparación con pesas patrones trazables al kilogramo Patrón del Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) de Sévres, París. Este Patrón consiste en un cilindro de platino/iridio (90/10) de 39 mm de diámetro y 39 mm de altura, con una densidad de 21,5 g/cm^3. La recalibración se debe realizar con una periodicidad de 2 a 7 años dependiendo del manipuleo, las condiciones de conservación y la frecuencia de uso.

La calibración de las balanzas mediante pesas patrones externas debe realizarse por lo menos una vez al año, incluyendo ensayos de excentricidad (no aplicable a balanzas de platillo suspendido) y repetitividad, esta última con no menos de diez valores.

Las pesas patrones a emplear dependerán de la sensibilidad de la balanza y la cantidad no será menor de siete, debiendo abarcar necesariamente los valores de pesada que se realicen en dicha balanza.

Sensibilidad de la balanza	Intervalo de pesas a emplear para la calibración
0,001mg	1 a 500 mg
0,01 mg	0,01 a 200 g
0,1 mg	0,05 a 400 g
1 mg	0,5 a 500 g
0,01 g	5 a 2.000 g
0,1 g	20 a 4.000 g

[NOTA: Las balanzas deber ser instaladas de manera tal de evitar las vibraciones y/o oscilaciones].

700. POLAROGRAFIA

La polarografía es un método electroquímico que proporciona información cualitativa y cuantitativa de sustancias electro-reducibles y electro-oxidables, basado en la medición del flujo de corriente resultante de la electrólisis de una solución en un microelectrodo polarizable, en función del voltaje aplicado. El intervalo de concentraciones para las sustancias que se analizan es de 10^{-2} a 10^{-5} M.

Esta medición puede realizarse por polarografía de corriente directa o de pulsos. A menos que se especifique de otro modo, emplear la técnica de corriente directa:

POLAROGRAFIA DE CORRIENTE DIRECTA

En la polarografía de corriente directa convencional, la corriente se mide continuamente mientras se aplica un potencial variable en forma lineal. Esta corriente se compone de dos elementos: el primero es la corriente de difusión, producida por la sustancia que experimenta la reducción u oxidación en el electrodo de trabajo y que es directamente proporcional a l a concentración de esta sustancia; y el segundo es la corriente capacitiva, relacionada con la carga de la doble capa electroquímica.

Un polarógrafo emplea un electrodo de goteo de mercurio (EGM) capaz de proporcionar un flujo constante de pequeñas gotas de mercurio, de tamaño reproducible, que fluyen del orificio de un tubo capilar conectado a un reservorio de mercurio, y un electrodo de referencia, generalmente de calomel saturado (ECS), el cual debe ser de superficie grande.

Al aplicar el voltaje inicial, se observa el flujo de una muy pequeña corriente residual; a medida que el voltaje aplicado varía; dicho flujo presenta mínimas variaciones, hasta que la sustancia bajo valoración experimenta la reducción u oxidación. Al principio la corriente aumenta gradualmente y luego lo hace de manera casi lineal con el voltaje hasta alcanzar un valor limitante. En la porción ascendente inicial de la onda polarográfica, el aumento del flujo de corriente se corresponde con una disminución de la concentración de las especies electroactivas en la superficie del electrodo. A medida que el voltaje y la corriente crecen, la concentración de las especies reactivas disminuye aún más hasta alcanzar un valor mínimo en la superficie del electrodo. La corriente está limitada por la velocidad a la cual las especies reaccionantes pueden difundir desde el seno de la solución hasta la superficie del microelectrodo, para que esto ocurra es necesaria la presencia de una elevada concentración de electrolito soporte, inerte dentro del intervalo de potencial empleado para el ensayo. La reacción del electrolito soporte por aumento del potencial causa el incremento final de la corriente, observada en los polarogramas.

En el caso del EGM, la superficie del electrodo se renueva constantemente en forma cíclica, por lo que la corriente aumenta de un valor pequeño cuando la gota comienza a formarse hasta alcanzar un valor máximo cuando la gota cae. Mediante el empleo de un registrador apropiado para medir la corriente, se obtiene el registro polarográfico característico con perfil de diente de sierra. La corriente limitante es la suma de la corriente residual y de difusión. La corriente residual se resta a la corriente limitante para obtener la altura de la onda. Los cambios en las corrientes de difusión y capacitiva, según la variación del tamaño de la gota, producen las oscilaciones en los polarogramas típicos.

La relación lineal entre la corriente de difusión, i_d, y la concentración de especies electro-activas está dada por la ecuación de Ilkovic:

$$i_d = 708nD^{1/2}m^{2/3}t^{1/6}c$$

en la cual i_d es la corriente máxima en microamperios, n es el número de electrones requeridos por molécula de sustancia electroactiva, D es el coeficiente de difusión en cm^2 por segundo, m es la velocidad de flujo de mercurio del EGM en mg por segundo, t es el tiempo de caída de la gota en segundos y c es la concentración del analito en milimoles por litro.

Los polarógrafos modernos, capaces de efectuar polarografía por muestreo, están equipados con registradores para determinar la corriente durante la última porción de la vida de la gota, registrando sólo las corrientes máximas y evitando las oscilaciones debidas al crecimiento de la gota.

Para aparatos en los que la corriente se mide con galvanómetros, las ondas con perfil de diente de sierra corresponden a o scilaciones cercanas a la corriente promedio, mientras que si se emplean registradores que operan en modo amortiguado, la medida de la corriente es el promedio de las oscilaciones. Para los polarogramas obtenidos de esta manera, la i_d, dada por la ecuación de Ilkovic es la corriente promedio en microamperios observada durante la vida de la gota, cuando el coeficiente 708 es reemplazado por 607.

Potencial de media-onda - El potencial de media-onda ($E_{1/2}$) corresponde, en el polarograma, al punto medio de la distancia entre la corriente residual y la meseta de la corriente limitante. Este potencial es por lo general independiente de la concentración del analito o del capilar empleado para obtener la onda, siendo característico de las especies electroactivas, por lo que sirve como criterio de identificación de una sustancia. El $E_{1/2}$ depende de la composición de la solución y puede cambiar con variaciones en el pH o en el sistema de solventes, o con el agregado de agentes complejantes.

A menos que se especifique de otro modo, el potencial del EGM es igual al voltaje aplicado frente al ECS, luego de realizar la corrección por la caída óhmica, iR (el potencial necesario para pasar la corriente, i, a través de una solución con una resistencia R). Es especialmente importante hacer esta corrección para soluciones no acuosas que poseen alta resistencia.

Medición de la altura de la onda (ver *Figura*) - Para fines cuantitativos, es necesario determinar la altura de la onda polarográfica. Ya que ésta es un índice de la magnitud de la corriente de difusión i_d, se mide verticalmente, compensado la corriente residual, por extrapolación del segmento de la curva que precede a la onda hasta más allá del ascenso en la misma. Para una onda bien formada donde esta extrapolación es paralela a la meseta de la corriente limitante, la medición no es ambigua. Para ondas no muy bien definidas, puede emplearse el siguiente procedimiento a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. Tanto la corriente residual como la corriente limitante se extrapolan con líneas rectas. La altura de la onda se toma como la distancia vertical entre estas líneas medidas a nivel del potencial de media-onda.

Precaución - El mercurio metálico tiene una presión de vapor importante a temperatura ambiente; por lo tanto, el área de trabajo debe construirse de modo que cualquier salpicadura o gota derramada puedan recuperarse completamente con relativa facilidad. Limpiar el mercurio después de cada empleo del aparato.

Procedimiento - Transferir una porción de la dilución final de la muestra a una celda polarográfica apropiada, inmersa en un baño de agua regulado a 25,0 ± 0,5 °C. Pasar una corriente de nitrógeno a través de la solución durante 10 a 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto. Comenzar el goteo de mercurio desde el capilar, insertar el capilar en la solución muestra y ajustar la altura del reservorio de mercurio. Modificar el flujo de nitrógeno de modo que pase sobre la superficie de la solución, a fin de que la misma esté libre de vibraciones durante el tiempo en que se registra la onda. Registrar el polarograma en el intervalo de potencial indicado en la monografía correspondiente, empleando un registrador o un galvanómetro de sensibilidad apropiada para obtener una onda apropiada. Medir la altura de la onda y, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, comparar ésta con la altura de la onda obtenida con la *Sustancia de referencia* correspondiente, medida bajo las mismas condiciones.

POLAROGRAFÍA DE PULSOS

En la polarografia de pulso normal, se aplica un pulso de potencial al electrodo de mercurio cerca del final de la vida de la gota. A cada gota siguiente se le aplica un pulso ligeramente mayor, con una velocidad de incremento-determinada por la velocidad de barrido seleccionada. La corriente se mide al término del pulso, representando principalmente la corriente de difusión, ya que en esas condiciones la corriente capacitiva es casi nula. La aplicación de pulsos cortos permite una sensibilidad aproximadamente diez veces mayor que la polarografía de corriente directa y la corriente limitante se mide con mayor facilidad, ya que las ondas están exentas de oscilaciones.

La polarografía de pulso diferencial es una técnica mediante la cual un pulso de altura fija aplicado al final de la vida de cada gota se superpone a una rampa de incremento lineal de corriente directa. El flujo de corriente se mide justo antes de la aplicación del pulso. La diferencia entre estas dos corrientes se mide y se representa en el registrador; dicha señal diferencial proporciona una curva que se aproxima a la derivada de la onda polarográfica, con pico cuyo potencial máximo es equivalente a:

$$E_{1/2} - \Delta E/2$$

donde ΔE es la altura del pulso. La altura del pico es directamente proporcional a la concentración a velocidades de barrido y alturas de pulso constante. Esta técnica es muy sensible (pueden determinarse concentraciones del orden de 10^{-7} M) y proporciona mejor resolución entre ondas poco espaciadas.

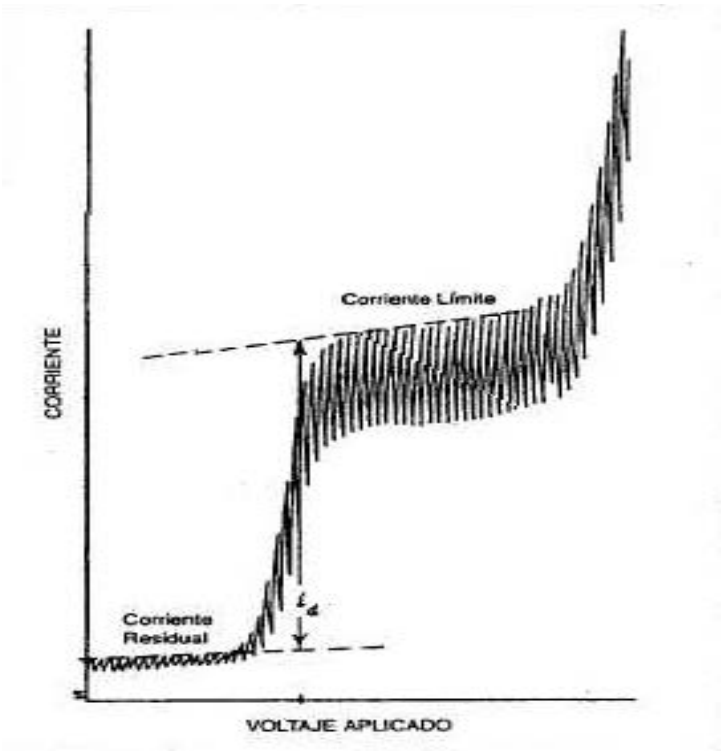


Figura. Medición de la altura de la onda.

710. SALES DE BASES ORGÁNICAS NITROGENADAS

Solución estándar - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, preparar una solución en ácido sulfúrico diluido (1 en 70) que contenga en cada ml, aproximadamente 500 µg de la *Sustancia de referencia* especificada, calculada sobre la sustancia anhidra y exactamente pesada.

Solución muestra - Si la forma farmacéutica es un comprimido, pesar y reducir a polvo fino no menos de veinte unidades. Pesar exactamente una porción del polvo, equivalente a 2 5 mg del principio activo, y transferirla a una ampolla de decantación de 125 ml. Si la forma farmacéutica es líquida, transferir un volumen de la misma exactamente medido, equivalente a 2 5 mg del principio activo, a una ampolla de decantación de 125 ml.

Agregar 20 ml de ácido sulfúrico diluido (1 en 350) a la ampolla de decantación y agitar durante 5 minutos. Agregar 20 ml de éter, agitar cuidadosamente, filtrar la fase ácida y transferirla a una segunda ampolla de decantación de 125 ml. Agitar la fase etérea con dos porciones de 10 ml de ácido sulfúrico diluido (1 en 350), filtrar cada porción de ácido en la segunda ampolla de decantación que contiene la fase ácida y descartar el éter. Agregar al extracto ácido 10 ml de hidróxido de sodio (SR) y 50 ml de éter, agitar cuidadosamente y separar ambas fases. La fase etérea se identifica como E1. Transferir la fase acuosa a una tercera ampolla de decantación de 125 ml que contenga 50 ml de éter. Agitar la tercera ampolla de decantación cuidadosamente y descartar la fase acuosa. La fase etérea se identifica como E2. Lavar la fase etérea E1 con 20 ml de agua, separar la fase acuosa y emplear esta última para lavar la fase etérea E2. Separar y descartar el agua. Extraer cada una de las dos fases etéreas, E1 y E2, con porciones de 20; 20 y 5 ml de ácido sulfúrico diluido (1 en 70) en ese orden, pero extrayendo cada vez primero la fase etérea E2 de la tercera ampolla de decantación y después la fase etérea E1 de la segunda ampolla de decantación. Combinar los extractos ácidos en un matraz aforado de 50 ml, diluir á volumen con ácido y mezclar. Esta fracción constituye la *Solución muestra*. [NOTA: el éter puede sustituirse por hexano o heptano si esto mejora la extracción].

Procedimiento - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, transferir 5,0 ml de la *Solución estándar* y 5,0 ml de la *Solución muestra* a sendos matraces aforados de 100 ml y completar a volumen con ácido sulfúrico diluido (1 en 70). Determinar la absorbancia de cada solución en celdas de 1 cm, a la longitud de onda especificada con un espectrofotómetro apropiado, empleando ácido sulfúrico diluido (1 en 70) como blanco. Designar la absorbancia de la solución obtenida a partir de la *Solución estándar* como A_E y la obtenida a partir de la *Solución muestra* como A_M. Calcular el resultado de la valoración según se especifica en la monografía correspondiente.

720. TERMOMETROS

Para seleccionar un termómetro, deben considerarse las condiciones bajo las cuales habrá de emplearse. En la *Tabla 1, Tabla 2* y *Tabla 3* se especifican las características de algunos termómetros útiles para los ensayos farmacopeicos.

Los límites inferior y superior del intervalo de temperatura especificado en las *Tablas* deben considerarse incluidos en el intervalo.

Tabla 1. Termómetros de uso general incluyendo determinaciones de intervalos de fusión.

Designación	Intervalo de temperatura (°C)	Graduaciones (°C)
TLG/1/−30/60	−30 a 60	1
TLG/1/0/100	0 a 100	1
TLG/1/0/300	−5 a 400	1
TLG/1/0/360	0 a 360	1

Tabla 2. Termómetros para la determinación de intervalos de ebullición o destilación y determinaciones de temperatura

Designación	Intervalo de temperaturas (°C)	Graduaciones (°C)
STL/0,2/−15/45	−15 a 45	0,2
STL/0,2/35/85	35 a 85	0,2
STL/0,2/75/125	75 a 125	0,2
STL/0,2/115/165	115 a 165	0,2
STL/0,2/155/205	155 a 205	0,2

Tabla 3. Termómetros para la determinación de intervalos de solidificación.

Designación	Intervalo de temperaturas (°C)	Graduaciones (°C)
STL/0,1/−25/5	−25 a 5	0,1
STL/0,1/−5/25	−5 a 25	0,1
STL/0,1/20/45	20 a 45	0,1
STL/0,1/40/65	40 a 65	0,1
STL/0,1/60/85	60 a 85	0,1
STL/0,1/80/105	80 a 105	0,1
STL/0,1/75/125	75 a 125	0,2
STL/0,1/125/165	125 a 165	0,2

730. TITULACIÓN CON NITRITO

Este método se emplea para la valoración de compuestos que posean amino primario aromático y sus formas farmacéuticas.

Sustancia de referencia - Sulfanilamida SR-FA.

Procedimiento - Transferir a un recipiente abierto aproximadamente 500 mg de muestra o la cantidad especificada en la monografía correspondiente, exactamente pesados. Agregar 20 ml de ácido clorhídrico y 50 ml de agua. Agitar hasta disolución, enfriar hasta aproximadamente 15 °C y titular lentamente con nitrito de sodio 0,1 M (SV) previamente estandarizado con la *Sustancia de referencia*.

Determinar el punto final empleando electrodos apropiados (platino-calomel o platino-platino). Colocar la punta de la bureta debajo de la superficie de la solución para evitar la oxidación del nitrito de sodio por el aire y agitar la solución suavemente empleando un agitador magnético. Mantener la temperatura a aproximadamente 15 °C. La titulación puede llevarse a cabo manualmente o a través de un titulador automático. En la valoración manual, agregar el titulante hasta 1 ml antes del punto final y luego agregar porciones de 0,1 ml, esperando no menos de 1 minuto o entre cada agregado.

El peso de la muestra, en mg, equivalente a cada ml de nitrito de sodio 0,1 M (SV), es especificado en la monografía correspondiente.

Para la valoración de comprimidos de sulfonamidas u otros principios activos, reducir a polvo fino no menos de veinte comprimidos. Transferir una porción del polvo, equivalente a 500 mg de muestra o la cantidad de principio activo especificado en la monografía correspondiente, exactamente pesados, a un recipiente abierto y proceder según se indica anteriormente comenzando donde dice "*Agregar 20 ml de ácido clorhídrico...*".

Para la valoración de soluciones inyectables y otras formas líquidas para las cuales se especifica la titulación con nitrito, transferir un volumen, equivalente a 500 mg de muestra o la cantidad de principio activo especificada en la monografía correspondiente, exactamente medido, a un recipiente abierto y proceder según se indica anteriormente comenzando donde dice "*Agregar 20 ml de ácido clorhídrico...*".

740. UNIFORMIDAD DE UNIDADES DE DOSIFICACIÓN

La uniformidad de las unidades de dosificación puede realizarse mediante dos ensayos: *Uniformidad de peso* y *Uniformidad de contenido*.

Los requisitos para la *Uniformidad de peso* deben aplicarse cuando el producto a ensayar contiene 50 mg o más de un principio activo el cual corresponde al 50 % o más del peso de la unidad de la forma farmacéutica. La uniformidad en otras unidades de dosificación que contienen principio activo en una proporción menor a la mencionada anteriormente debe demostrarse mediante *Uniformidad de contenido*. Pero este último ensayo se exige en todos los casos para: Comprimidos recubiertos (excepto los de cubierta fílmica), Sistemas transdérmicos, Suspensiones en envases unitarios o contenidas en cápsulas blandas, Aerosoles dosificadores y Supositorios.

Uniformidad de peso

Para determinar la uniformidad de unidades de dosificación mediante uniformidad de peso, seleccionar no menos de treinta unidades y proceder según se indica para cada forma farmacéutica:

Comprimidos y Comprimidos con cubierta fílmica - Pesar exactamente y en forma individual diez comprimidos. A partir del resultado de la *Valoración* obtenido según se indica en la monografía correspondiente calcular el contenido de principio activo en cada uno de los diez comprimidos, asumiendo que dicho principio activo está uniformemente distribuido.

Cápsulas rígidas - Pesar exactamente y en forma individual diez cápsulas rígidas intactas, teniendo cuidado de conservar la identidad de cada unidad. Vaciar el contenido de cada cápsula. Pesar exactamente las cápsulas vacías individualmente y calcular para cada cápsula el peso de su contenido, restando al peso original de la misma el peso de la cápsula vacía. Calcular el contenido de principio activo en cada una de las diez cápsulas, empleando el resultado de la Valoración obtenido según se indica en la monografía correspondiente, asumiendo que dicho principio activo está uniformemente distribuido.

Cápsulas blandas - Pesar exactamente y en forma individual diez cápsulas intactas para obtener el peso original de cada una, teniendo cuidado de conservar la identidad de cada cápsula. Cortar las cápsulas y extraer el contenido mediante el lavado con un solvente apropiado. Dejar que el solvente ocluido en las cápsulas se evapore a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos; evitando absorción o pérdida de humedad. Pesar exactamente y en forma individual las cápsulas vacías. Calcular el contenido neto de cada cápsula, restando al peso original el peso de cada unidad vacía. Calcular el contenido de principio activo en cada una de las diez cápsulas, empleando el resultado de la *Valoración* obtenido según se indica en la monografía correspondiente, asumiendo que dicho principio activo está uniformemente distribuido.

Sólidos (incluyendo sólidos estériles) - Proceder según se indica en Cápsulas rígidas.

Soluciones para inhalaciones – Proceder según se indica en *Cápsulas rígidas*.

Soluciones orales y jarabes - Pesar exactamente y en forma individual la cantidad de líquido que drena en no más de 5 segundos de diez unidades. Si fuera necesario tener en cuenta el volumen equivalente después de determinar la densidad aparente. Calcular el contenido de principio activo en cada una de las diez unidades, empleando el resultado de la *Valoración* obtenido según se indica en la monografía correspondiente.

Uniformidad de contenido

Para la determinación de uniformidad de unidades de dosificación mediante la valoración de unidades individuales, seleccionar no menos de treinta unidades y proceder según se indica:

Valorar diez unidades individualmente según se indica en la *Valoración*, a menos que se indique de otro modo en el *Procedimiento para uniformidad de contenido* en la monografía correspondiente. Cuándo la cantidad de principio activo en una unidad de dosificación es menor que la requerida en la *Valoración*, ajustar el grado de dilución de las soluciones y/o el volumen de las alícuotas para que la concentración de los principios activos en la solución final sea del mismo orden que la obtenida en la valoración; o, para el caso de una titulación, si fuera necesario, emplear un titulante más diluido, procurando emplear un volumen apropiado del mismo (ver *780. Volumetría*). Si se empleara cualquiera de estas modificaciones en la *Valoración* que establece la monografía correspondiente, realizar los cambios apropiados en la fórmula y en el factor de titulación.

Cuando se especifique un *Procedimiento especial para uniformidad de contenido* en la monografía correspondiente, se deben hacer las correcciones necesarias de los resultados obtenidos según se indica a continuación:

(1) Preparar una muestra con un número suficiente de unidades para proporcionar la cantidad de muestra requerida en la *Valoración*, más la cantidad requerida para el *Procedimiento para*

Uniformidad de contenido especificado en la monografía correspondiente. Reducir a polvo fino los comprimidos o mezclar el contenido de las cápsulas, suspensiones o sólidos en envases monodosis para obtener una mezcla homogénea. Si de esta manera no puede obtenerse una mezcla homogénea, emplear solventes apropiados u otros procedimientos para preparar una solución que contenga todo el principio activo y emplear alícuotas apropiadas de esta solución.

(2) Valorar separadamente porciones exactamente medidas de la muestra: (a) según se indica en la *Valoración* y (b) empleando el *Procedimiento especial para uniformidad de contenido* especificado en la monografía correspondiente.

(3) Calcular el peso de principio activo equivalente a una unidad de dosificación promedio, empleando: (a) el resultado obtenido en la *Valoración* y (b) el resultado obtenido por el *Procedimiento especial para uniformidad de contenido especificado* en la monografía correspondiente.

(4) Calcular el factor de corrección, *F*, por la fórmula siguiente:

$$F = A/P$$

en la cual *A* es el peso de principio activo equivalente a una unidad de dosificación promedio, obtenido en la valoración y *P* es el peso de principio activo equivalente a u na unidad de dosificación promedio, obtenido por el *Procedimiento especial para uniformidad de contenido especificado* en la monografía correspondiente.

$$\text{Si,} \quad \frac{\left(100\left|A-P\right|\right)}{A} > 10$$

el empleo de un factor de corrección no es válido.

(5) Una corrección válida puede aplicarse sólo si *F* no es menor de 1,030 ni mayor de 1,100 o no menor de 0,900 ni mayor de 0,970. Si *F* está comprendido entre 0,970 y 1,030 no se requiere ninguna corrección.

(6) Si *F* se encuentra entre 1,030 y 1,100 o entre 0,900 y 0,970; calcular el peso de principio activo en cada unidad de dosificación, multiplicando cada uno de los pesos hallados empleando el *Procedimiento especial para uniformidad de contenido* especificado en la monografía correspondiente por el factor *F*.

Criterios

Aplicar los siguientes criterios, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente.

(A) Si el promedio de los límites especificados en la definición de concentración o potencia de cada producto en la monografía correspondiente es 100,0 % o menos.

COMPRIMIDOS, COMPRIMIDOS RECUBIERTOS, COMPRIMIDOS CON CUBIERTA FÍLMICA, SUPOSITORIOS, SUSPENSIONES, SOLUCIONES ORALES y JARABES, SÓLIDOS (INCLUYENDO SÓLIDOS ESTÉRILES) y SÓLIDOS ESTÉRILES PARA USO PARENTERAL - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos para la uniformidad se cumplen si la cantidad de principio activo en cada una de las diez unidades de dosificación determinada empleando el método de *Uniformidad de peso* o *Uniformidad de contenido* se encuentra dentro del intervalo de 85,0 a 115,0 % del valor declarado y la desviación estándar relativa menor o igual a 6,0 %.

Si una unidad está fuera de dicho intervalo y ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado, si la desviación estándar relativa es mayor a 6,0 % o si ambas condiciones prevalecen, ensayar veinte unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de una unidad de las treinta unidades de dosificación está fuera del intervalo de 85,0 a 115,0 % del valor declarado, ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y la desviación estándar relativa de no es mayor a 7,8 %.

CÁPSULAS, SISTEMAS TRANSDÉRMICOS y SOLUCIONES PARA INHALACIÓN - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos para la uniformidad se cumplen si la cantidad de principio activo en no menos de nueve de las diez unidades de dosificación determinada empleando el método de *Uniformidad de peso* o *Uniformidad de contenido* se encuentra dentro del intervalo de 85,0 a 115,0 % del valor declarado, ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y la desviación estándar relativa es menor o igual a 6,0 %.

Si dos o t res unidades de dosificación están fuera del intervalo de 85,0 a 115,0 % del valor declarado, pero no fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado, si la desviación estándar relativa es mayor a 6,0 % o si ambas condiciones prevalecen, ensayar veinte unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de tres unidades de las treinta unidades de dosificación están fuera del intervalo de, 85,0 a 115,0 % del valor declarado, ninguna unidad está fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y la desviación estándar relativa no es mayor a 7,8 %.

AEROSOLES DOSIFICADORES - [NOTA: una unidad de dosificación se define como el líquido

obtenido accionando la válvula, tantas veces como se indique en el rótulo, para obtener la dosis recomendada. Seguir las indicaciones de uso indicadas en el rótulo. Para la obtención de la unidad de dosificación del inhalador, proceder según se indica en el ensayo para *Uniformidad de contenido de la dosis* en *390. Ensayos farmacéuticos para aerosoles.*] A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, los requisitos para la uniformidad se cumplen si la cantidad de principio activo liberado en no más de una de las diez unidades de dosificación, determinada según el método de *Uniformidad de contenido* cae fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y ninguna unidad está fuera del intervalo de 65,0 a 135,0 % del valor declarado. Si dos o t res unidades de dosificación se encuentran fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado, pero no fuera del intervalo de 65,0 a 135,0 % del valor declarado, ensayar veinte unidades adicionales. Los requisitos se cumplen si no más de tres unidades de las treinta unidades de dosificación están fuera del intervalo de 75,0 a 125,0 % del valor declarado y ninguna unidad está fuera del intervalo de 65,0 a 135,0 % del valor declarado.

(B) Si el promedio de los límites especificados en la definición de concentración o potencia de cada producto en la monografía correspondiente es mayor de 100,0 %.

(1) Si el valor del promedio de las unidades de dosificación ensayadas es mayor o igual al promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía correspondiente, los requisitos son los descriptos en *(A)*, excepto que las palabras *valor declarado* se reemplazan por las palabras "valor declarado multiplicado por el promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía correspondiente dividido 100".

(2) Si el valor promedió de las unidades de dosificación ensayadas está entre 100 % y e l promedio de los límites especificados en la definición de potencia en la monografía correspondiente, los requisitos son los descriptos en *(A)*, excepto que las palabras *valor declarado* se reemplazan por las palabras "valor declarado multiplicador por el valor promedio de las unidades de dosificación ensayadas (expresado como porcentaje del valor declarado) dividido 100".

745. VACUNAS DE USO HUMANO

Ver *745. Vacunas de Uso Humano* en *Apartado de Vacunas* en *Volumen III.*

750. VALORACIÓN DE ESTEROIDES

Los siguientes procedimientos se aplican a la determinación de esteroides codificados en la Farmacopea que poseen grupos funcionales reductores, como por ejemplo α-cetoles. A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, emplear el método de *Valoración directa*.

VALORACIÓN DIRECTA

Solución estándar - Disolver en alcohol una cantidad apropiada de la *Sustancia de referencia* especificada en la monografía correspondiente, previamente secada bajo las condiciones especificadas y exactamente pesada. Diluir cuantitativamente y en etapas con alcohol hasta obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 10 µg por ml. Transferir 20 ml de esta solución a un erlenmeyer de 50 ml con tapón de vidrio.

Solución muestra - Proceder según se especifique en la monografía correspondiente.

Procedimiento - Agregar a cada uno de los dos erlenmeyer que contienen la *Solución muestra* y la *Solución estándar* y a un erlenmeyer similar que contiene 20,0 ml de alcohol que se empleará como blanco, 2,0 ml de una solución preparada disolviendo 50 mg de azul de tetrazolio en 10 ml de metanol, y mezclar. Agregar 2,0 ml de una mezcla de alcohol e hidróxido de tetrametilamonio (SR) (9:1) a cada erlenmeyer, mezclar y dejar reposar en la oscuridad durante exactamente 90 minutos. Determinar las absorbancias de las soluciones obtenidas partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar* en celdas de 1 cm, a 525 nm, con un espectrofotómetro apropiado, contra el blanco.

Calcular la cantidad de sustancia valorada empleando la fórmula indicada en la monografía correspondiente, en la cual C es la concentración; en µg por ml, de la *Solución estándar* y A_M y A_E son las absorbancias de las soluciones obtenidas a partir de la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, respectivamente.

VALORACIÓN DE UN ESTEROIDE AISLADO PREVIAMENTE

En el siguiente procedimiento, el esteroide a valorar es separado de los esteroides relacionados y excipientes por cromatografía en capa delgada y valorado luego empleando el método descrito anteriormente. Emplear este método cuando se especifique en la monografía correspondiente.

Preparación de la placa - Preparar una mezcla de 30 g de gel de sílice para cromatografía y una sustancia fluorescente apropiada con 65 ml de una mezcla de agua y alcohol (5:2). Extender la mezcla a una placa, de 20 cm × 20 cm hasta obtener una capa uniforme de 0,25 mm de espesor y dejar secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Activar la placa a 105 °C durante 1 hora y almacenar en un desecador.

Fase móvil A - Cloruro de metileno y metanol (45:4).

Fase móvil B - Cloroformo y acetona (4:1).

Solución estándar - Disolver una cantidad apropiada de la *Sustancia de referencia* especificada en la monografía correspondiente, previamente secada y exactamente pesada, en una mezcla de cloroformo y alcohol (50:50), hasta obtener una solución con una concentración conocida de aproximadamente 2 mg por ml.

Solución muestra - Proceder según se especifique en la monografía correspondiente.

Procedimiento - Dividir la placa cromatográfica en tres secciones iguales; las secciones laterales se emplearán para aplicar la *Solución muestra* y la *Solución estándar*, respectivamente. En la sección central se aplicará el blanco. Aplicar 200 µl de la Solución muestra y 200 µl de *Solución estándar* en bandas, a una distancia de 2,5 cm del borde de la placa, en la sección correspondiente. Secar con la ayuda de una corriente de aire, sin calentar. Empleando la *Fase móvil* especificada en la monografía correspondiente, desarrollar la placa hasta que el frente del solvente haya corrido aproximadamente 15 cm por encima de la zona de siembra. Retirar la placa de la cámara, marcar el frente del solvente y dejar evaporar. Examinar la placa bajo luz ultravioleta y marcar la banda principal en la sección de la placa correspondiente a la *Solución estándar*. Marcar también las bandas correspondientes en las secciones de la *Solución muestra* y del blanco de la placa. Retirar el gel de sílice de cada banda por separado y transferirlo a sendos tubos de centrífuga de 50 ml con tapa de vidrio. A cada tubo agregar 25,0 ml de alcohol y agitar durante 2 minutos. Centrifugar durante 5 minutos, transferir 20 ml de la solución sobrenadante de cada tubo a un erlenmeyer de 50 ml con tapa de vidrio, agregar 2,0 ml de una solución preparada disolviendo 50 mg de azul de tetrazolio en 10 ml de metanol y mezclar. Proceder según se indica en el *Procedimiento* en *Valoración directa*, comenzando donde dice: "*Agregar 2,0 ml de una mezcla...* ".

760. VALORACIÓN IODOMÉTRICA DE ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS

Solución estándar - Disolver una cantidad de la *Sustancia de referencia* especificada en la monografía correspondiente, previamente secada y exactamente pesada, en el solvente especificado en la *Tabla*. Diluir cuantitativamente y en etapas con el mismo solvente hasta obtener una solución con una concentración conocida aproximada a la especificada en la *Tabla*. Transferir 2,0 ml de esta solución a cada uno de dos erlenmeyers con tapón de vidrio de 125 ml.

Solución muestra - A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, disolver una cantidad de muestra, exactamente pesada, en el solvente especificado en la *Tabla*. Diluir cuantitativamente con el mismo solvente hasta obtener una solución con una concentración final conocida aproximada a la especificada en la *Tabla*. Transferir 2,0 ml de esta solución a cada uno de dos erlenmeyers con tapón de vidrio de 125 ml.

Procedimiento -

Inactivación y titulación - Agregar a 2,0 ml de la *Solución estándar* y a 2,0 ml de la *Solución muestra*, 2,0 ml de hidróxido de sodio 1,0 N, mezclar por rotación y dejar en reposo durante 15 minutos. Agregar a cada erlenmeyer 2,0 ml de ácido clorhídrico 1,2 N y 10,0 ml de iodo 0,01 N (SV). Tapar de inmediato y dejar reposar durante 15 minutos. Titular con tiosulfato de sodio 0,01 N (SV). Agregar antes del punto final 1 gota de ioduro-almidón (SR) y continuar la titulación hasta que el color azul desaparezca.

Titulación del blanco - Agregar 10,0 ml de iodo 0,01 N (SV) a un erlenmeyer que contenga 2,0 ml de la *Solución estándar*. Si la *Solución estándar* contiene amoxicilina o ampicilina, agregar de inmediato 0,1 ml de ácido clorhídrico 1,2 N. Seguidamente, titular con tiosulfato de sodio 0,01 N (SV). Agregar antes del punto final 1 gota de ioduro-almidón (SR) y continuar la titulación hasta que el color azul desaparezca. Proceder de forma similar con 2,0 ml de la *Solución muestra.*

Cálculos - Determinar los µg o unidades, *F*, equivalentes a cada ml de tiosulfato de sodio 0,01 N empleados para titular la *Solución estándar*, por la fórmula siguiente:

$$(2CM)/(B-1)$$

en la cual *C* es la concentración, en mg por ml, de *Sustancia de referencia* en la *Solución estándar*, *M* es la potencia, en µg por mg o unidades, de la *Sustancia de referencia*, *B* es el volumen, en ml, de tiosulfato de sodio 0,01 N empleado en la *Titulación del blanco* e *I* es el volumen, en ml, de tiosulfato de sodio 0,01 N empleado en la *Inactivación y titulación*. Calcular la potencia de la muestra por la fórmula dada en la monografía correspondiente.

Tabla. Solventes y concentraciones finales.

Antibiótico	Solvente[1]	Concentración final
Amoxicilina	Agua	1,0 mg por ml
Ampicilina	Agua	1,25 mg por ml
Ampicilina sódica	*Solución reguladora N° 1*	1,25 mg por ml
Bencilpenicilina potásica	*Solución reguladora N° 1*	2.000 unidades por ml
Bencilpenicilina sódica	*Solución reguladora N° 1*	2.000 unidades por ml
Cloxacilina sódica	Agua	1,25 mg por ml
Ciclacilina	Agua	1,0 mg por ml
Dicloxacilina sódica	*Solución reguladora N° 1*	1,25 mg por ml
Feneticilina potásica	*Solución reguladora N° 1*	2.000 unidades por ml
Fenoximetilpenicilina potásica	*Solución reguladora N° 1*	2.000 unidades por ml
Meticilina sódica	*Solución reguladora N° 1*	1,25 mg por ml
Nafcilina sódica	*Solución reguladora N° 1*	1,25 mg por ml
Oxacilina sódica	*Solución reguladora N° 1*	1,25 mg por ml

[1] A menos que se especifique de otro modo, las *Soluciones reguladoras* son las soluciones de fosfato de potasio definidas en *Diluyentes y medios* en *770. Valoración microbiológica de antibióticos*. No se requiere su esterilización antes de usar.

Actualización parcial

770. VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA DE ANTIBIÓTICOS

La valoración microbiológica de antibióticos se realiza comparando, en idénticas condiciones de ensayo, la inhibición de la multiplicación de microorganismos sensibles producida por concentraciones conocidas de una *Sustancia de referencia* frente a la inhibición producida por diluciones del antibiótico que se está valorando. Estos ensayos ponen de manifiesto la verdadera actividad antimicrobiana del producto. En este capítulo se presentan los procedimientos para la valoración de los antibióticos de esta Farmacopea, para los cuales la valoración microbiológica es el método de referencia.

Las *Sustancias de referencia* empleadas en los ensayos microbiológicos son sustancias cuya potencia (actividad) ha sido determinada con precisión frente una *Sustancia de referencia* trazable al patrón internacional o a la preparación de referencia internacional correspondiente.

El ensayo debe ser diseñado de forma tal que permita verificar la validez del modelo matemático sobre el que se basa la ecuación del cálculo de potencia. Si se escoge un modelo de líneas paralelas, las dos rectas formadas por logaritmo de dosis y respuestas (o respuesta transformada) correspondientes a la preparación muestra y a la preparación de referencia deben ser paralelas. Asimismo, deben ser lineales en el intervalo de dosis empleado para el cálculo. También ambas rectas deben tener una regresión significativa. Estas condiciones deben verificarse mediante pruebas de validez para una determinada probabilidad, generalmente p=0,05.

Para determinar si un antibiótico cumple con los requisitos de potencia especificados en la monografía correspondiente; debe repetirse la valoración y combinarse los resultados estadísticamente hasta lograr la precisión requerida. Esta debe ser tal que los límites de confianza (P=0,95), expresados porcentualmente, se encuentren dentro del intervalo de potencia especificado en la monografía correspondiente.

Se emplean dos métodos generales: método de difusión en agar o en placa y método turbidimétrico o en tubo. El primero se basa en la difusión del antibiótico desde un punto de aplicación, a través de una capa de agar inoculado con el microorganismo de ensayo. La difusión origina zonas o halos de inhibición del microorganismo, cuyo tamaño (diámetro) está en relación con la concentración de antibiótico. El método turbidimétrico se efectúa en un medio de cultivo líquido inoculado con un microorganismo de ensayo, al que se le agregan concentraciones crecientes del antibiótico. Luego del período de incubación se determina la turbidez producida por el desarrollo microbiano, la cual está en función de la concentración del antibiótico.

Para obtener el intervalo de concentraciones de trabajo, debe realizarse previamente una curva dosis-respuesta y aplicar los métodos estadísticos apropiados (ver *Cálculos*).

Sustancias de referencia y unidades

La potencia de los antibióticos se expresa en Unidades o µg de actividad. En cada caso, la Unidad o µg de actividad antibiótica se establece y define internacionalmente. [NOTA: no se debe asumir que la Unidad debe necesariamente corresponder a los µg (peso) del antibiótico].

DILUYENTES Y MEDIOS

Soluciones reguladoras de fosfato y otras soluciones

Las soluciones reguladoras se deben esterilizar luego de ser preparadas y el pH recomendado en cada caso corresponde al determinado luego de su esterilización.

Solución reguladora N 1 (1 %; pH 6,0) - Disolver 2,0 g de fosfato dibásico de potasio y 8,0 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua. Ajustar a pH 6,00 ± 0,05 con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N.

Solución reguladora N° 3 (0,1 M; pH 8,0) - Disolver 16,73 g de fosfato dibásico de potasio y 0,523 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua. Ajustar a pH 8,0 ± 0,1 con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N.

Solución reguladora N° 4 (0,1 M; pH 4,5) - Disolver 13,61 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua. Ajustar a pH 4,50 ± 0,05 con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N.

Solución reguladora N° 6 (10 %; pH 6,0) - Disolver 20,0 g de fosfato dibásico de potasio y 80,0 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de agua. Ajustar a pH 6,00 ± 0,05 con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N.

Solución reguladora N° 10 (0,2 M; pH 10,5) - Disolver 35,0 g de fosfato dibásico de potasio en 1 litro de agua y agregar 2 ml de hidróxido de potasio 10 N. Ajustar a pH 10,5 ± 0,1 con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N.

Solución reguladora N° 16 (0,1 M; pH 7,0) - Disolver 13,6 g de fosfato dibásico de potasio y 4,0 g de fosfato monobásico de potasio en 1 litro de

agua. Ajustar a pH 7,0 ± 0,2 con ácido fosfórico 18 N o hidróxido de potasio 10 N.

Otras soluciones - Emplear las sustancias especificadas en *Reactivos y Soluciones*. Cuando se indique agua, emplear *Agua purificada*; cuando se indique solución fisiológica, emplear *Solución Inyectable de cloruro de sodio*; cuando se indique formaldehído diluido, emplear *Solución de formaldehído* diluida 1:3 con agua.

Medios

Los medios empleados para la preparación del inóculo microbiano y para la realización del ensayo están constituidos por los componentes que se indican a continuación. Se admiten modificaciones menores de los componentes individuales o el empleo de medios deshidratados reconstituidos, siempre que los medios resultantes posean iguales o mejores propiedades para estimular el desarrollo microbiano y proporcionen una curva dosis-respuesta, similar.

Se deben disolver los componentes y agregar agua hasta obtener un litro. Se requiere que las soluciones se ajusten con hidróxido de sodio 1 N o con ácido clorhídrico 1 N de manera que luego de la esterilización por vapor se obtenga el pH especificado.

Medio 1

Peptona	6,0 g
Digerido pancreático de caseína	4,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne vacuna	1,5 g
Dextrosa	1,0 g
Agar	5,0 g
Agua c.s.p	1.000 ml

pH después de la esterlización: 6,6 ±0,1.

Medio 2

Peptona	6,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Extracto de carne vacuna	1,5 g
Agar	15,0 g
Agua c.s.p	1.000 ml

pH después de la esterilización: 6,6 ± 0,1.

Medio 3.

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	1,5 g
Extracto de carne vacuna	1,5 g
Cloruro de sodio	3,5 g
Dextrosa	1,0 g
Fosfato dibásico de potasio	3,68 g
Fosfato monobásico de potasio	1,32 g
Agua c.s.p	1.000 ml

pH después de la esterilización: 7,00 ± 0,05

Medio 5

Proceder del mismo modo que para el *Medio 2*, excepto que el pH final después de la esterilización debe ser: 7,9 ± 0,1.

Medio 8

Proceder del mismo modo que para el *Medio 2*, excepto que el pH final después de la esterilización debe ser: 5,9 ± 0,1.

Medio 9

Digerido pancreático de caseína	7,0 g
Digerido papaínico de soja	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato dibásico de potasio	2,5 g
Dextrosa	2,5 g
Agar	20,0 g
Agua c.p.s	1.000 ml

pH después de la esterilización: 7,2 ± 0,1.

Medio 10

Proceder del mismo modo que para el *Medio 9*, excepto que se deben emplear 12,0 g de agar en lugar de 20,0 g y agregar 10 ml de Polisorbato 80 después de calentar a ebullición el medio para disolver el agar. El pH después de la esterilización debe ser: 7,2 ± 0,1.

Medio 11

Proceder del mismo modo que para el *Medio 1*, excepto que el pH final después de la esterilización debe ser: 8,3 ± 0,1.

Medio 13

Dextrosa	20,0 g
Peptona	10,0 g
Agua c.p.s	1.000 ml

pH después de la esterilización: 5,6 ± 0,1.

Medio 19

Peptona	9,4 g
Extracto de levadura	4,7 g
Extracto de carne vacuna	2,4 g
Cloruro de sodio	10,0 g
Dextrosa	10,0 g
Agar	23,5 g
Agua c.s.p	1.000 ml

pH después de la esterilización: 6,1 ± 0,1.

Medio 32

Proceder del mismo modo que para el *Medio 1*, excepto que se deben agregar 0,3 g de sulfato de manganeso.

Medio 34

Glicerina	10,0 g
Peptona	10,0 g
Extracto de carne vacuna	10,0 g
Cloruro de sodio	3,0 g
Agua c.p.s	1.000 ml

pH después de la esterilización: 7,0 ± 0,1.

Medio 35

Proceder del mismo modo que para el *Medio 34*, excepto que se deben agregar 17,0 g de agar.

Medio 36

Digerido pancreático de caseína	15,0 g
Digerido papaínico de soja	5,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	15,0 g
Agua c.s.p	1.000 ml

pH después de la esterilización: 7,3 ± 0,1.

Medio 39

Proceder del mismo modo que para que el *Medio 3*, excepto que el pH final después de la esterilización debe ser: 7,9 ± 0,1.

Medio 40

Extracto de levadura	20,0 g
Polipeptona	5,0 g
Dextrosa	10,0 g
Fosfato monobásico de potasio	2,0 g
Polisorbato 80	0,1 g
Agar	10,0 g
Agua c.s.p	1.000 ml

pH después de la esterilización: 6,7 ± 0,2.

Medio 41

Digerido pancreático de caseína	9,0 g
Dextrosa	20,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
Citrato de sodio	10,0 g
Fosfato monobásico de sodio	1,0 g
Fosfato dibásico de potasio	1,0 g
Agua c.s.p	1.000 g

pH después de la esterilización: 6,8 ± 0,1.

CONDICIONES GENERALES DE ENSAYO

Los términos potencia declarada, potencia supuesta, relación de potencia y potencia estimada se emplean para indicar los siguientes conceptos:

Potencia declarada o en etiqueta - En el caso de un producto formulado, es un valor nominal asignado a partir del conocimiento de la potencia del material a granel; en el caso de material a granel, es la potencia estimada por el elaborador.

Potencia supuesta o asumida - Es la potencia provisoriamente asignada de una preparación muestra que forma la base del cálculo de las dosis que podrían ser equipotentes con las dosis a emplear de la preparación patrón.

Potencia asignada - Es la potencia de la preparación estándar.

Relación de Potencias - Es la razón de dosis equipotentes de la preparación patrón y la preparación muestra, bajo las condiciones del ensayo.

Potencia estimada - Es la potencia a partir de los datos del ensayo.

Preparación del estándar -

Preparar una solución madre del estándar disolviendo una cantidad previamente secada, si fuera necesario, y exactamente pesada de la *Sustancia de referencia* correspondiente. Diluir con el solvente especificado en la *Tabla 1* hasta obtener la concentración indicada. Almacenar la solución en un refrigerador y emplearla dentro del período de uso indicado. En el día del ensayo preparar, a partir de la solución madre del estándar, tres o más diluciones en progresión geométrica empleando el diluyente especificado.

Preparación de la muestra -

Se debe asumir una potencia por unidad de peso o volumen de acuerdo con la información disponible de la preparación muestra. Bajo esta hipótesis se debe preparar en el día del ensayo una solución madre de la muestra y tres o más diluciones en progresión geométrica equipotentes con las preparadas de estándar como se especifica para cada antibiótico. Emplear los mismos diluyentes que se indican para la *Sustancia de referencia*.

Preparación del microorganismo de ensayo-

Se recomienda emplear preferentemente cepas de colección, las que se repicarán periódicamente en medios apropiados para el mantenimiento de los microorganismos según se indica en la *Tabla 3*. De ser posible, las cepas deben ser liofilizadas para su mejor conservación. El microorganismo a emplear con cada antibiótico se especifica en la *Tabla 2.*

Preparación de la suspensión y estandarización - El microorganismo a emplearse se repica en tubos de ensayo que contengan el medio apropiado solidificado en forma inclinada y se incuba a tiempo y temperatura apropiados. Una vez desarrollados los microorganismos:

a- Para el caso de ensayo en placa: suspenderlos con el agregado de Solución fisiológica (SR) estéril y la ayuda de perlas de vidrio estériles obteniendo así la suspensión original.

b- Para el caso de ensayo en tubo: tomar una ansada del cultivo, inocular 100 ml de medio líquido e incubar durante 16 a 24 horas a temperatura apropiada obteniendo así la suspensión original.

La suspensión original (a) se estandariza espectrofotométricamente efectuando la dilución indicada en la *Tabla 3* en solución fisiológica (SR) estéril, a 580 nm, llevándola a una transmitancia de 25 %, pudiendo ser necesario ajustar la suspensión original y empleando solución fisiológica (SR) como blanco. Si se prepara la suspensión original (b), se emplea como blanco una porción del mismo medio líquido sin inocular.

Preparación de la suspensión de esporas y estandarización - Repicar los microorganismos en tubos de ensayo que contengan el medio apropiado solidificado en forma inclinada. Incubar de 16 a 24 horas a una temperatura de 32 a 35 °C. Suspender el desarrollo del microorganismo así en solución fisiológica (SR) estéril con la ayuda de perlas de vidrio estériles. Transferir la suspensión proveniente de los tubos de repique a una botella de Roux que contenga 250 ml del *Medio 32* y dispersar sobre toda la superficie con ayuda de las perlas de vidrio estériles. Incubar de 5 a 7 días a una temperatura de 32 a 35 °C.

El cultivo así obtenido se suspende en 50 ml de agua estéril y se calienta a 65 °C durante 30 minutos en un baño termostatizado para eliminar las formas vegetativas. Centrifugar a 3.000 rpm. durante 20 minutos y descartar el sobrenadante. Repetir este procedimiento no menos de tres veces, a partir del agregado de *Agua purificada estéril*. Luego de la última centrifugación, descartar el sobrenadante, resuspender y llevar nuevamente a 65 °C durante 30 minutos. Las esporas así preparadas y almacenadas a una temperatura de 2 a 8 °C tienen una vida útil aproximada de 6 meses. Verificar el rendimiento del proceso con coloración para esporas y Gram (aproximadamente 80 % de formación de esporas).

Debe realizarse un ensayo en placa para asegurar la viabilidad de las esporas y determinar el volumen de suspensión de esporas a agregar por cada 100 ml de medio de cultivo.

Para ambos métodos de valoración, determinar por medio de ensayos preliminares el volumen de suspensión original a emplear como inóculo cada 100 ml de medio de cultivo, comenzando con el volumen sugerido en la *Tabla 3*, de modo tal que se obtengan como respuesta las zonas de inhibición claramente definidas y de diámetro conveniente o una turbidez apropiada a las diferentes dosis de *Sustancia de referencia*.

MÉTODOS GENERALES DE VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA

Método de difusión en agar

Procedimiento - De acuerdo con el antibiótico a valorar, fundir una cantidad suficiente de medio de cultivo estéril según se indica en la *Tabla 3*, enfriar a temperatura apropiada (por ej., entre 45 y 50 °C para las formas vegetativas), inocular el medio y agitar por rotación hasta lograr una suspensión homogénea.

Emplear placas de Petri o bandejas rectangulares de fondo plano y, trabajando sobre una superficie plana y horizontal, verter en las placas un volumen determinado de medio inoculado para formar una capa uniforme de 2 a 5 mm de espesor. Alternativamente, el medio puede estar formado por dos capas, aunque sólo se inocule la superior.

Para algunos microorganismos de ensayo, el procedimiento puede mejorarse si las placas inoculadas se dejan secar durante 30 minutos antes de ser empleadas o si se refrigeran a 4 °C durante varias horas.

Los reservorios empleados generalmente son cilindros estériles de porcelana, de acero inoxidable o de cualquier otro material apropiado, discos estériles de papel o pocillos excavados en el agar. El volumen que se carga en los reservorios debe ser uniforme y con una tolerancia máxima de 5 %.

Emplear los solventes y las soluciones reguladoras indicadas en la *Tabla 1* para preparar las soluciones de la *Sustancia de referencia* y las del antibiótico a ensayar. Para asegurar la validez de la valoración, emplear por lo menos tres concentraciones diferentes de la *Sustancia de referencia* y tres concentraciones del antibiótico a ensayar que presumiblemente tengan la misma actividad que las soluciones de la *Sustancia de referencia*. Se deben emplear series de concentraciones en progresión geométrica para aplicar el método estadístico (ver *Cálculos*).

Distribuir las diluciones en cada placa de Petri o en cada placa rectangular, según un plan estadísticamente apropiado. En el caso de placas pequeñas que no pueden contener más de seis diluciones, alternar las diluciones del antibiótico y las diluciones de la *Sustancia de referencia*, con el fin de evitar cualquier interacción entre las diluciones de mayor concentración.

Las placas de Petri deben incubarse sin invertirla temperatura indicada ± 0,5 °C durante 18 horas aproximadamente. Es aconsejable un período de predifusión antes de la incubación, que puede oscilar de 30 minutos a 4 horas, a temperatura ambiente o próxima a 4°C, según el caso, esto tiene por finalidad reducir los efectos de desfasaje de tiempo entre la aplicación de las diferentes soluciones sobre las placas y así mejorar la recta de regresión o bien obtener halos mayores y más nítidos.

Empleando un instrumento de medición apropiado, medir el diámetro de cada halo con una precisión de hasta la décima de mm. Calcular la actividad empleando métodos estadísticos apropiados (ver *Cálculos*). Emplear el suficiente número de réplicas por concentración de antibiótico en cada ensayo (no menos de cuatro placas) para asegurar la precisión estadística.

Método turbidimétrico

Procedimiento - Inocular un volumen de medio de cultivo preferentemente conservado a una temperatura de 2 a 8 °C, con un volumen determinado de suspensión original estandarizada del microorganismo apropiado y emplearlo inmediatamente.

Para preparar las soluciones de la *Sustancia de referencia* y las soluciones del antibiótico a ensayar en concentraciones que se consideren iguales, emplear los solventes y las soluciones reguladoras indicadas en la *Tabla 1*.

En tubos de ensayo estériles e idénticos, transferir volúmenes iguales de cada solución y agregar el mismo volumen de medio de cultivo inoculado a cada uno de ellos (como por ej., 1 ml de solución y 9 ml de medio).

Preparar simultáneamente dos tubos control que contengan cada uno 9 ml de medio de cultivo inoculado y 1 ml de solvente empleado (sin antibiótico). Agregar inmediatamente a uno de ellos 0,5 ml de formaldehído diluido. Este tubo será empleado como blanco y sirve para calibrar el espectrofotómetro. El tubo restante, constituye el testigo de crecimiento que se emplea para determinar la finalización de la incubación.

Para asegurar la validez de la valoración, emplear por lo menos tres concentraciones diferentes de la *Sustancia de referencia* y tres concentraciones del antibiótico a ensayar que presumiblemente tengan la misma actividad que las soluciones de la *Sustancia de referencia*. Se deben emplear series de concentraciones en progresión geométrica para aplicar el método estadístico (ver *Cálculos*).

Ubicar todos los tubos, distribuidos al azar, en cuadrado latino o en bloques aleatorios, en un baño de agua a 37 °C (28 °C para *Candicidina*). Tomar precauciones para asegurar una distribución homogénea del calor e idéntico tiempo de incubación, generalmente de 2 a 4 horas.

Luego de la incubación, detener la multiplicación de los microorganismos por adición al azar de 0,5 ml de formaldehído diluido a cada tubo, excepto a los tubos rotulados como blanco. Medir la turbidez del contenido de cada tubo con un espectrofotómetro apropiado, a 530 nm. Calcular la actividad empleando los método estadísticos apropiados (ver *Cálculos*).

En cada ensayo, emplear el número de réplicas por concentración de antibiótico (no menor de cuatro tubos) para asegurar la precisión estadística.

[NOTA: el procedimiento para ambos métodos, debe realizarse en condiciones asépticas].

ANALISIS ESTADÍSTICO

Curva Dosis-Respuesta - Para comprobar si cualquier ensayo en particular se está realizando por el modelo de rectas paralelas, es necesario examinar, previo a la realización de ensayos de rutina, la relación dosis respuesta del componente activo. Cuando la diferencia entre la relación del logaritmo de la dosis y la respuesta de la preparación patrón, se desvía notablemente del efecto teórico, el modelo de rectas paralelas no es válido para este ensayo en particular. Debe verificarse que en el intervalo de dosis empleado en los ensayos, la relación entre el logaritmo de dosis y la respuesta; es representada por una recta de adecuada regresión y linealidad, con una probabilidad de 0,05.

Diseños de ensayo - La asignación de las unidades experimentales a los diferentes tratamientos pueden realizarse de distintas formas.

Diseño completamente aleatorio - Si la totalidad de las unidades experimentales parece ser razonablemente homogénea, sin indicación alguna de que la variabilidad de la respuesta sea distinta dentro de ciertos subgrupos reconocibles la asignación de las unidades a los diferentes tratamientos debe hacerse aleatoriamente.

Diseño en bloque aleatorio - En este diseño, es posible segregar una fuente identificable de variación, tal como la variación entre placas de Petri en un ensayo microbiológico por difusión. El diseño requiere que todos los tratamientos se apliquen el mismo número de veces en cada bloque (placa de Petri) y es apropiado solamente cuando el bloque es lo suficientemente grande como para acomodar todos los tratamientos.

Diseño de cuadrado latino - Este diseño es apropiado cuando la respuesta puede verse afectada por dos fuentes diferentes de variación, cada una de las cuales puede asumir k niveles o posiciones diferentes. En un ensayo en placa de un antibiótico, los tratamientos pueden disponerse en una serie de $k \times k$ sobre una placa grande, realizándose cada tratamiento una vez en cada fila y en cada columna. El diseño es apropiado cuando el número de filas, el número de columnas y el número de tratamientos son iguales.

Pruebas de validez

El ensayo es estadísticamente válido si el resultado del análisis de la varianza cumple como mínimo con los siguientes requisitos:

1- Regresión: debe ser significativa para un valor de $p \leq 0,05$. El estadístico F calculado debe ser mayor que el F que figura en la tabla de Fischer para un valor de $\alpha \leq 0,05$ para los grados de libertad correspondientes al numerador y denominador del estadístico F calculado.

2- Desvío del paralelismo: debe ser no significativo para un valor de $p \geq 0,05$. El estadístico *F* calculado debe ser menor que el *F* que figura en la tabla de Fischer para un valor de $\alpha \geq 0,05$ para los grados de libertad correspondientes al numerador y denominador del estadístico *F* calculado.

3- Desvío de la linealidad: debe ser no significativa para un valor de $p \geq 0,05$. EI estadístico *F* calculado debe ser menor que el *F* que figura en la tabla de Fischer para un valor de $\alpha \geq 0,05$ para los grados de libertad correspondientes al numerador y denominador del estadístico *F* calculado.

Sólo una vez que se ha demostrado la validez estadística del ensayo puede calcularse la potencia de la preparación desconocida y sus intervalos de confianza aplicando los cálculos que se describen en *Cálculos*.

[NOTA: para ambos métodos de valoración, si la potencia calculada es menor de 80 % o mayor de 125 % que la supuesta para el producto o antibiótico analizado, ajustar las concentraciones de las soluciones muestra hasta alcanzar igual actividad supuesta que las soluciones de referencia y repetir la valoración].

Cálculos

Tabla para el registro de respuestas.

	P_1	P_2	P_3	…	P_d	M_1	M_2	M3	…	M_d	R
A											R_A
B											R_B
.											.
.											.
.											.
n											R_n
N	S_1	S_2	S_3	…	S_n	T_1	T_2	T_3	…	T_n	

Donde $P_1 < P_2 < P_3$ y $M_1 < M_2 < M_3$

Fórmulas para efectuar el ANOVA para el modelo de rectas paralelas con d dosis de cada preparación.

	Estándar (S)	Muestra 1 (T)	Muestra 2 (U)
Respuesta media de la menor dosis	S_1	T_1	U_1
Respuesta media de la segunda dosis	S_2	T_2	U_2
…..	…	…	…
Respuesta media de la mayor dosis	S_d	T_d	U_d
Total de las preparaciones	$P_s = S_1 + S_2 + \ldots + S_d$	$P_T = T_1 + T_2 + \ldots + T_d$	$P_U = U_1 + U_2 + \ldots + U_d$
Contraste lineal	$L_s = 1S_1 + 2S_2 + \ldots + dS_d - {}^1/_2\,(d+1)\,P_s$	$L_T = 1T_1 + 2T_2 + \ldots + dT_d - {}^1/_2\,(d+1)\,P_T$	$\underline{L_U = 1U_1 + 2U_2 + \ldots + dU_d} - {}^1/_2\,(d\text{-}1)\,P_U$

d: Número de dosis por tratamiento.
h: Número de preparaciones.
n: Número de réplicas.
hd: Número de tratamientos.

Fórmulas adicionales para el análisis de varianza:

$$H_p = \frac{n}{d} \qquad H_L = \frac{12n}{d^3 - d} \qquad K = \frac{n\left(P_S + P_T + \ldots\right)^2}{hd}$$

Fórmulas para cálculo de Suma de Cuadrados y grados de libertad.

Fuentes de variación	Grados de libertad (g)	Suma de cuadrados (SC)
Preparaciones	h–1	$SC_{prep} = H_P\,(P_S^2 + P_T^2 + \ldots) - K$
Regresión lineal	1	$SC_{reg} = 1/h\ H_L\,(L_S + L_T + \ldots)^2$
Desviación del paralelismo	h–1	$SC_{desv.par} = H_L\,(L_S^2 + L_T^2 + \ldots) - SC_{reg}$
Desviación de linealidad	h (d –2)	$SC_{desv.lin} = SC_{trat.} - SC_{prep} - SC_{reg} - SC_{desv.par}$
Tratamientos	hd–1	$SC_{trat} = n\,(S_1^2 + S_2^2 + \ldots + S_d^2 + T_1^2 + T_2^2 + \ldots + T_d^2) - K$

Estimación del Error Residual.

Fuentes de variación		Grados de libertad (g)	Suma de Cuadrados (SC)
Bloques (Filas) (*)		$n-1$	$SC_{bloques} = \left(R_A{}^2 + ... + R_n{}^2\right)/hd - K$
Columnas (**)		$n-1$	$SC_{col.} = hd\left(C_1{}^2 + ... + C_d{}^2\right) - K$
Error Residual	**Comp. Aleatorizado**	$hd\left(n-1\right)$	$SC_{residual} = SC_{tot} - SC_{trat}$
	Aleat. En Bloques	$\left(hd-1\right)\left(n-1\right)$	$SC_{residual} = SC_{tot} - SC_{trat} - SC_{bloques}$
	Cuadrado latino	$\left(hd-2\right)\left(n-1\right)$	$SC_{residual} = SC_{tot} - SC_{trat} - SC_{filas} - SC_{colum}$
TOTAL		$\left(nhd-1\right)$	$SC_{tot} = \sum y_j - G^2/N$

(*) No se calcula para el diseño completamente aleatorizado. R es la media de respuestas para cada bloque o fila.

(**) Solo se calcula para el diseño cuadrado latino.

El cuadrado medio de cada una de las fuentes de variación se calcula como el cociente entre la Suma de Cuadrados (SC) y sus correspondientes grados de libertad.

$$CM_{fte.de\,\text{var}iación} = \frac{SC_{fte.de\,\text{var}iación}}{gl_{fte.de\,\text{var}iación}}$$

El *F* calculado es el cociente entre el Cuadrado Medio (CM) de la fuente de variación y el Cuadrado Medio del Error ($CM_{error} = s^2$).

$$F_{calculado} = \frac{CM_{fte.de\,\text{var}iación}}{CM_{error}}$$

Estimación de potencia e Intervalos de Confianza:

$$I = Log\left(\frac{P_2}{P_1}\right) = LogP_2 - LogP_1 \qquad V = \frac{SC_{reg}}{b^2 dn}$$

$$b = \frac{H_L\left(L_S + L_T + ...\right)}{Inh} \qquad C = \frac{SC_{reg}.}{SC_{reg}. - s^2 \times t^2}$$

$$M'_T = \frac{P_T - P_S}{db}$$

$$M'_{Sup} = C \times M'_T + \sqrt{(C-1)\left[C \times (M'_T)^2 + 2 \times V\right]}$$

$$M'_{Inf} = C \times M'_T - \sqrt{(C-1)\left[C \times (M'_T)^2 + 2 \times V\right]}$$

$$R = anti\log M'_T \qquad R_{\inf} = anti\log M'_{\inf}$$

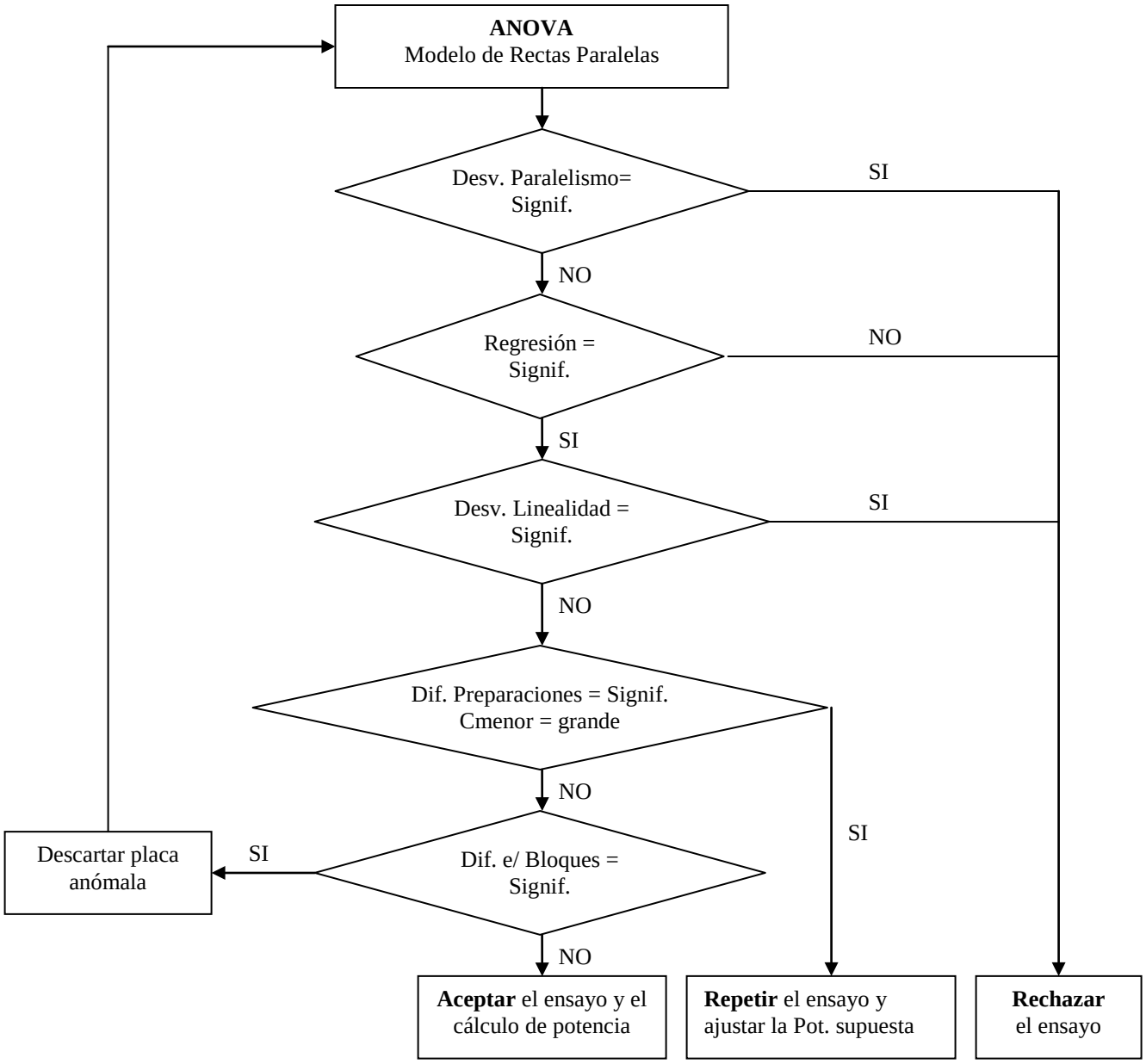
$$R_{\sup} = anti\log M'_{\sup}$$

$Potencia_{estimada} = R \times Potencia_{\sup uesta}$ Límite de Confianza

$$Límite\ de\ Confianza_{\sup erior} = R_{\sup} \times Potencia_{Supuesta}$$

$$Límite\ de\ Confianza_{Inferior} = R_{Inf} \times Potencia_{Supuesta}$$

Diagrama de flujo de las pruebas de validez para el modelo de rectas paralelas



Curva Dosis-Respuesta:

Tabla para el registro de respuestas.

	P_1	P_2	P_3	…	P_d	R
A						R_A
B						R_B
.						.
.						.
.						.
n						R_n
N	S_1	S_2	S_3	…	S_d	

Donde $P_1 < P_2 < P_d$

Fórmulas para cálculo de Suma de Cuadrados y grados de libertad

Fuentes de variación	Grados de libertad (g)	Suma de cuadrados (SC)
Regresión lineal	1	$SC_{reg} = (Sxy)^2 / (Sxx)$
Desviación de Linealidad	$d-2$	$SC_{desv.Lin.} = SC_{trat} - SC_{reg.}$
Tratamientos	$d-1$	$SC_{trat.} = \sum (Ti^2 / n_i) - G^2 / N$
Error	$(d-1)(n-1)$	$SC_{error} = SC_{total} - SC_{trat.} - SC_{bloques}$
Total	$dn-1$	$SC_{total} = \sum Y^2 - G^2 / N$

$$S_{xy} = \sum X_i T_i - \left(\sum n_i \; x_i \sum T_i\right) / N$$

$$S_{xx} = \sum n_i x_i^2 - \left(\sum n_i x_i\right)^2 / N$$

Glosario

A-B-…-N: Réplicas o bloques según corresponda al diseño estadístico.
b : Pendiente de la regresión lineal en los logaritmos de las dosis.
C: Estadístico empleado para el cálculo de los Intervalos de Confianza
CM: Cuadrado medio: cociente entre la Suma de Cuadrados de la fuente de variación y sus grados de libertad.
d: Número de niveles de dosis para cada preparación.
dh: Número total de tratamientos en la valoración.
F: Estadístico a comparar con el valor tabulado en tablas de distribución *F* de Ficher para los grados de libertad correspondientes al numerador y denominador del estadístico *F* calculado.

$$F_{calculado} = \frac{CM_{fte.de\,variación}}{CM_{error}}$$

G^2/N: $(\Sigma y_i)^2/N$

h: Número de preparaciones en la valoración que incluyen a la del estándar.
H_p, H_T: Multiplicadores empleados en el análisis de Varianza para Rectas Paralelas.
I: Logaritmo de la relación entre dosis adyacentes.
K: Factor de corrección en los cálculos de Suma de Cuadrados en el Análisis de la Varianza.
L: Longitud de intervalos de Confianza en logaritmo.
L_S, L_T: contraste lineal para el Estándar y Muestra respectivamente.
M´: Logaritmo de la relación de Potencias.
n: número de réplicas para cada tratamiento.
N: número total de respuestas.
P_1-P_2-...-P_n-M_1-M_2-...-M_n: Dosis de estándar y muestra respectivamente.
P_S, P_T: respuestas medias.
R: Potencia estimada de la preparación a ensayar.
R´: Relación de potencias.
R_1,…,R_n: Respuesta media en cada fila para el diseño de Cuadrado Latino o de cada Bloque para el diseño de bloques aleatórios.
s: Estimador del desvío estándar.

$$s = \sqrt{s^2}$$

S_1,…,S_n: Respuesta media para cada preparación de Estándar.
s^2: Estimador de la varianza por el Cuadrado Medio del Error en el ANOVA.
t: Estadístico de Student.
T_1,…,T_n: Respuesta media para cada preparación muestra.
T_i: Sumatoria de respuestas para la dosis i en curva dosis-respuesta.
V: Coeficiente de la Varianza para el cálculo de los límites de confianza.
x: Logaritmo de la dosis.
y: Respuesta individual o su transformación.

Tabla 1. Preparación de soluciones madre y diluciones de ensayo de *Sustancias de referencia*

	Solución madre			Solución muestra	
Antibiótico y tipo de valoración [Difusión en placa (DP) o Turbidimétrico (T)]	Solvente inicial (y concentración inicial en donde se especifique); diluyente adicional, si es diferente	Concentración final por ml	Período de uso	Diluyente final	Dosis intermedia (µg de actividad o Unidades por ml)
Amikacina (T)	Agua	1 mg	14 días	Agua	10 µg
Anfotericina B (DP)	Dimetilsulfóxido	1 mg	Mismo día	*B.* 10	1,0 µg
Bacitracina cinc (DP)	Ácido clorhídrico 0,01 N	100 U	Mismo día	*B.* 1	1,0 U
Bleomicina (DP)	*B.* 16	2 U	14 días	*B.* 16	0,04 U
Candicidina (T)	Dimetilsulfóxido	1 mg	Mismo día	Agua	0,06 µg
Capreomicina (T)	Agua	1 mg	7 días	Agua	100 µg
Carbenicilina (DP)	*B.* 1	1 mg	14 días	*B.* 1	20 µg
Cefalotina (DP)	*B.* 1	1 mg	5 días	*B.* 1	1,0 µg
Cicloserina (T)	Agua	1 mg	30 días	Agua	50 µg
Cloranfenicol (T)	Alcohol (10 mg/ml); [Agua]	1 mg	30 días	Agua	2,5 µg
Clortetraciclina (T)	Ácido clorhídrico 0,01 N	1 mg	4 días	Agua	0,06 µg
Cloxacilina (DP)	*B.* 1	1 mg	7 días	*B.* 1	5,0 µg
Colistimetato sódico (DP)	Agua (10 mg/ml); [*B.* 6]	1 mg	Mismo día	*B.* 6	1,0 µg
Colistina (DP)	Agua (10 mg/ml); [*B.* 6]	1 mg	14 días	*B.* 6	1,0 µg
Democlociclina (T)	Ácido clorhídrico 0,1 N	1 mg	4 días	Agua	0,1 µg
Dihidroestreptomicina (DP)	*B.* 3	1 mg	30 días	*B.* 3	1,0 µg
Dihidroestreptomicina (T)	Agua	1 mg	30 días	Agua	30 µg
Doxiciclina (T)	Ácido clorhídrico 0,1 N	1 mg	5 días	Agua	0,1 µg
Eritromicina (DP)	Metanol (10 mg/ml); [*B.* 3]	1 mg	14 días	*B.* 3	1,0 µg
Estreptomicina (T)	agua	1 mg	30 días	Agua	30 µg

Tabla 1. - continuación. Preparación de soluciones madre y diluciones de ensayo de *Sustancias de referencia*.

	Solución madre			Solución muestra	
Antibiótico y tipo de valoración [Difusión en placa (DP) o Turbidimétrico (T)]	Solvente inicial (y concentración inicial en donde se especifique); diluyente adicional, si es diferente	Concentración final por ml	Período de uso	Diluyente final	Dosis intermedia (µg de actividad o Unidades por ml)
Gentamicina (DP)	*B.* 3	1 mg	30 día	*B.* 3	0,1 µg
Gramicidina (T)	Alcohol al 95 %	1 mg	30 días	Alcohol al 95 %	0,04 µg
Kanamicina (T)	Agua	1 mg	30 días	Agua	10,0 µg
Metaciclina (T)	Agua	1 mg	7 días	Agua	0,06 µg
Nafcilina(DP)	*B.* 1	1 mg	2 días	*B.* 1	2,0 µg
Natamicina (DP)	Dimetilsulfóxido	1 mg	Mismo día	*B.* 10	5,00 µg
Neomicina (DP)	*B.* 3	1 mg	14 días	*B.* 3	1,0 µg
Neomicina (T)	*B.* 3	100 µg	14 días	*B.* 3	1,0 µg
Netilmicina (DP)	*B.* 3	1 mg	7 días	*B.* 3	0,1 µg
Nistatina (DP)	Dimetilformamida	1.000 U	Mismo día	*B.* 6	20 U
Novobiocina (DP)	Alcohol (10 mg/ml); [*B.* 3]	1 mg	5 días	*B.* 6	0,5 µg
Oxitetraciclina (T)	Ácido clorhídrico 0,1 N	1 mg	4 días	Agua	0,24 µg
Paromomicina (DP)	*B.* 3	1 mg	21 días	*B.* 3	1,0 µg
Penicilina G (DP)	[*B.* 1]	1.000 U	4 días	*B.* 1	1,0 Ug
Polimixina B (DP)	Agua; *B*. 6	10.000 U	14 días	*B.* 6	10 Ug
Rolitetraciclina (T)	Agua	1 mg	1 día	Agua	0,24 µg
Sisomicina (DP)	*B.* 3	1 mg	14 días	*B.* 3	0,1 µg
Tetraciclina (T)	Ácido clorhídrico 0,1 N	1 mg	1 día	Agua	0,24 µg
Ticarcilina (DP)	*B*. 1	1 mg	1 día	*B.* 1	5,0 µg
Tobramicina (T)	Agua	1 mg	14 días	Agua	2,5 µg

Solución madre				Solución muestra	
Antibiótico y tipo de valoración [Difusión en placa (DP) o Turbidimétrico (T)]	Solvente inicial (y concentración inicial en donde se especifique); diluyente adicional, si es diferente	Concentración final por ml	Período de uso	Diluyente final	Dosis intermedia (µg de actividad o Unidades por ml)
Troleandomicina (T)	Alcohol isopropílico-agua (4:1)	1 mg	Mismo día	Agua	25 µg
Vancomicina (DP)	Agua	1 mg	7 días	*B.* 4	10 µg

NOTAS -

"B" indica "solución reguladora" y el número siguiente se refiere a las soluciones reguladoras de fosfato de potasio definidas en este capítulo.

Para anfotericina B, colistimetato sódico y nistatina, preparar las soluciones de la *Sustancia de referencia* y la *Solución muestra* simultáneamente.

Para anfotericina B, diluir adicionalmente la *Solución madre* con dimetilsulfóxido hasta obtener una serie de soluciones cuya concentración intermedia sea de 20 µg por ml antes de hacer las soluciones muestra. La *Solución muestra* debe contener la misma cantidad de dimetilsulfóxido que las soluciones de la *Sustancia de referencia*.

Para bacitracina cinc, cada una de las diluciones del estándar debe contener la misma cantidad de ácido clorhídrico que la *Solución muestra*.

Para la valoración turbidimétrica de neomicina, diluir la *Solución madre* de 100 µg por ml cuantitativamente con *Solución reguladora N° 3* hasta obtener una solución que tenga una concentración equivalente a 25,0 µg de neomicina por ml. Para cada *Solución muestra* agregar 5,0 ml de ácido clorhídrico 0,01 N a cada matraz aforado, diluir a volumen con *Solución reguladora N°3* y mezclar para obtener una serie de soluciones cuya concentración intermedia sea de 1,0 µg de neomicina por ml.

Para nistatina, diluir adicionalmente la *Solución madre* con dimetilformamida hasta obtener una concentración intermedia de 400 Unidades por ml antes de hacer las *Soluciones muestra*. Las *Soluciones muestra* deben contener la misma cantidad de dimetilformamida que las *Soluciones estándar*. Emplear material inactínico de vidrio.

Para Polimixina B, preparar la *Solución madre* mediante el agregado de 2 ml de agua por cada 5 mg de *Sustancia de referencia*.

Tabla 2. Organismos de ensayo para antibióticos valorados según el procedimiento indicado en la *Tabla 1*.

Antibiótico	Organismo de Ensayo	Número ATCC *
Amikacina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Anfotericina B	*Saccaromyces cerevisiae*	9.763
Bacitracina	*Micrococcus luteus*	10.240
Bleomicina	*Mycobacterium smegmatis*	607
Candicidina	*Saccaromyces cerevisiae*	9.763
Capreomicina	*Klebsiella pneumoniae*	10.031
Carbenicilina	*Pseudomonas aeruginosa*	25.619
Cefalotina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Cicloserina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Cloranfenicol	*Escherichia coli*	10.536
Clortetraciclina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Cloxacilina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Colistimetato sódico	*Bordetella bronchiseptica*	4.617
Colistina	*Bordetella bronchiseptica*	4.617
Democlociclina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Dihidroestreptomicina (DP)	*Bacillus subtilis*	6.633
Dihidroestreptomicina (T)	*Klebsiella pneumoniae*	10.031
Doxiciclina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Eritromicina	*Micrococcus luteus*	9.341
Espectinomicina	*Escherichia coli*	10.536
Estreptomicina (T)	*Klebsiella pneumoniae*	10.031
Gentamicina	*Staphylococcus epidermidis*	12.228
Gramicidina	*Streptococcus faecium*	10.541
Kanamicina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Metaciclina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Nafcilina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Neomicina (DP)	*Staphylococcus epidermidis*	12.228
Neomicina (T)	*Klebsiella pneumoniae*	10.031
Netilmicina	*Staphylococcus epidermidis*	12.228
Nistatina	*Saccaromyces cerevisiae*	2.601

Tabla 2 - continuación. Organismos de ensayo para antibióticos valorados según el procedimiento indicado en la *Tabla 1*.

Antibiótico	Organismo de Ensayo	Número ATCC *
Novobiocina	*Staphylococcus epidermidis*	12.228
Oxitetraciclina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Paromomocina	*Staphylococcus epidermidis*	12.228
Penicilina G	*Staphylococcus auerus*	29.737
Polimixina B	*Bordetella bronchiseptica*	4.617
Rolitetraciclina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Sisomicina	*Staphylococcus epidermidis*	12.228
Tetraciclina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Tobramicina	*Staphylococcus auerus*	29.737
Troleandomicina	*Klebsiella pneumoniae*	10.031
Vancomicina	*Bacillus subtilis*	6.631

American Type Culture Collection, 12.301 Parklawn drive, Rockville, MD 20852, EEUU.
Pueden emplearse también otras cepas de colección de características equivalentes, como ser:
NCTC (*National Collection of Type Cultures*), Central Publish Health Laboratory, Colindone Av, London NW 95HT, Inglaterra.
NCYC (*National Collection of Yeast Cultures*), Brewing Industry Research Fundation, Nutfield, Redhill RH 14 HY, Surrey, Inglaterra.
NCIB (*National Collection of Industry Bacteria*), Torry Research Station, PO Box 31, 135 AbbeyRoad, Aberdeen AB) 8 DG, Escocia.

Tabla 3. Preparación del inóculo.

Condiciones de incubación					Condiciones para inocular el medio de cultivo		
Organismo de ensayo y N° ATCC	Medio	Temp.	Tiempo (horas)	Dilución de la susp. original (25 % T)	Medio	Cantidad (ml por 100 ml)	Antibióticos analizados
Bacillus subtilis (6.633)	32	32 a 35	5 días	(esporas)	5	Según sea necesario	Dihidroestreptomicina
					8	Según sea necesario	Vancomicina
Bordetella bronchiseptica (4.617)	1	32 a 35	24 días	1:20	10	0,1	Colistimetato sódico, Colistina, Polimixina B
Escherichia coli (10.536)	1	32 a 35	24días	1:20	3	0,7	Cloranfenicol
Klebsiella pneumoniae (10.031)	1	36 a 37,5	16 a 24	1:25	3	0,05	Capreomicina
						0,1	Estreptomicina, Dihidroestreptomicina
							Troleandomicina
					39	2	Neomicina
Micrococcus luteus (9.341)	1	32 a 35	24	1:40	11	1,5	Eritromicina
Micrococcus luteus (10.240)	1	32 a 35	24		1	0,3	Bacitracina
Mycobacterium smegmatis (607)	36	36 a 37,5	48		35	1	Bleomicina
Pseudomonas aeruginosa (25.619)	1	36 a 37,5	24	1:25	10	0,5	Carbenicilina
Saccharomyces cerevisiae (9.763)	19	29 a 31	48	1:30	13	0,2	Candicidina
					19	1	Anfotericina B

Tabla 3 - continuación – Preparación del inóculo.

Condiciones de incubación				Condiciones para inocular el medio de cultivo			
Organismo de ensayo y N° ATCC	Medio	Temp.	Tiempo (horas)	Dilución de la susp. Original (25 % T)	Medio	Cantidad (ml por 100 ml)	Antibióticos analizados
Saccharomyces cerevisiae (2.601)	19	29 a 31	48		19	1	Nistatina
Staphylococcus auerus (29.737)	1	32 a 35	24	1:20	1	0,1	Cefalotina, Cloxacilina
					1	0,3	Nafcilina
					1	1	Penicilina G
					3	0,1	Amikacina, Clortetraciclina, Democlociclina, Doxiciclina, Metaciclina, Oxitetraciclina, Rolitetraciclina, Tetraciclina
					3	0,2	Kanamicina
					3	0,4	Cicloserina
					3	0,15	Tobramicina
Staphylococcus epídermidis (12.228)	1	32 a 35	24	1:14	11	0,25	Netilmicina
					1	4	Novobiocina
					11	0,03	Gentmicina, Sisomicina
					11	0,4	Neomicina
					11	2	Paromomicina
Streptococcus faecium (10.541)	3	36 a 37,5	16 a 18		3	1	Gramicidina

780. VOLUMETRIA

Titulación directa - Se emplea para la determinación de sustancias en solución, con un titulante apropiado. El punto final se determina instrumentalmente o visualmente con un indicador apropiado.

El titulante se agrega desde una bureta de capacidad apropiada elegida de acuerdo a l a concentración del titulante (normalidad), de modo tal que el volumen consumido sea entre 30 y 100 % de su capacidad nominal. La aproximación al punto final se hace en forma directa agregando gota a gota el titulante con la precaución de que la última gota agregada no sobrepase el punto final.

La cantidad de muestra titulada se calcula a partir del volumen consumido, la normalidad o factor de molaridad del titulante y el factor de equivalencia especificado en la monografía correspondiente.

Titulación residual o Titulación por retorno - En algunas titulaciones se agrega un volumen medido de un titulante, mayor al necesario para reaccionar con la muestra. El exceso de esta solución es titulado posteriormente con un segundo titulante. La cantidad de muestra titulada se calcula a partir de la diferencia entre el volumen de titulante originalmente agregado y el volumen consumido por el segundo titulante en la titulación por retorno, las normalidades o los factores de molaridad y el factor de equivalencia especificado en la monografía correspondiente.

Titulación complejométrica - Algunos cationes polivalentes se pueden titular directamente mediante el empleo de reactivos con los cuales forman complejos o q uelatos. La obtención de un resultado satisfactorio en una complejometría depende del indicador elegido.

Titulación por óxido-reducción - Estas titulaciones se realizan cuando entre la sustancia activa del titulante y la muestra se produce una reacción por intermedio de un intercambio electrónico, en la que una de ellas actúa como reductora (cede electrones) mientras que la otra se comporta como oxidante (adquiere electrones). Estas titulaciones se clasifican en: métodos por oxidación, cuando la sustancia activa del titulante tiene tendencia a dar formas reducidas, adquiriendo electrones (oxidantes), y métodos por reducción, cuando la sustancia activa del titulante puede dar formas oxidadas cediendo electrones (reductor).

Titulación en medio no acuoso - Muchas sustancias adquieren mejores propiedades ácidas o básicas cuando se disuelven en solventes orgánicos. Por lo tanto, la elección del solvente apropiado permite la titulación de gran variedad de sustancias mediante esta técnica.

En el caso de una sustancia básica, se emplea como titulante ácido perclórico en ácido acético glacial, aunque en casos especiales se emplea ácido perclórico en dioxano. El sistema de electrodos de vidrio-calomel resulta útil en estas determinaciones.

En el caso de una sustancia ácida, se emplean como titulantes alcóxidos de metales alcalinos o hidróxidos de tetralquilamonio. Con frecuencia se emplea metóxido de sodio en una mezcla de metanol y tolueno, aunque el metóxido de litio en metanol benceno es empleado para titular sustancias que producen un precipitado gelatinoso en las titulaciones con metóxido de sodio.

El error alcalino limita el empleo del electrodo de vidrio como electrodo indicador cuando se emplean alcohóxidos de metales alcalinos como titulantes, en particular en solventes básicos. Por lo tanto, el electrodo indicador de antimonio, aunque algo errático, resulta útil en dichos casos. El empleo de hidróxidos de amonio cuaternario, por ej., el hidróxido de tetra *n*-butilamonio y el hidróxido de trimetilhexadecilamonio (en benceno-metanol o a lcohol isopropílico), presenta dos ventajas sobre los otros titulantes: (a) la sal de tetralquilamonio del ácido titulado es soluble en el medio de reacción y (b) se puede emplear un electrodo de vidrio calomel.

Los solventes empleados en la titulación de sustancias ácidas se deben proteger de la exposición excesiva al aire atmosférico debido a la interferencia producida por el dióxido de carbono. Para ello se emplea una atmósfera inerte durante la titulación. La absorción de dióxido de carbono se puede determinar mediante la titulación con un blanco. El blanco no debe consumir más de 0,01 ml de metóxido de sodio 0,4 N (SV) por ml de solvente.

El punto final se puede determinar visualmente observando el cambio de color de un indicador o potenciométricamente, según se especifique en la monografía correspondiente. Si se emplea un electrodo de calomel como electrodo de referencia, se recomienda reemplazar la solución acuosa de cloruro de potasio del puente salino por perclorato de litio 0,1 N en ácido acético glacial para titulaciones en solventes ácidos o cloruro de potasio en metanol para titulaciones en solventes básicos. Cuando en la monografía correspondiente se recomienda la modificación del electrodo de

calomel con éstas o con otras mezclas no acuosas es necesario retirar previamente la solución de cloruro de potasio y lavar con agua para eliminar el cloruro de potasio residual. Luego se elimina el agua residual con el solvente no acuoso indicado y finalmente se llena el electrodo con la mezcla no acuosa indicada.

Los sistemas más útiles para titulación en solventes no acuosos se indican en la *Tabla 1*.

Detección del punto final - El método más sencillo para determinar el punto de equivalencia es mediante el empleo de indicadores.

Los indicadores son sustancias químicas, generalmente coloreadas, que responden a cambios en la solución antes y después del punto de equivalencia presentando cambios de color que pueden ser detectados visualmente como el punto final de la reacción, lo que constituye una estimación confiable del punto de equivalencia.

Otro método útil es mediante mediciones electroquímicas. Si un electrodo indicador, sensible a la concentración de las especies que experimentan la reacción volumétrica, y un electrodo de referencias cuyo potencial es insensible a cualquier especie disuelta, se sumergen en la solución a titular para formar una celda galvánica, la diferencia de potencial entre los electrodos puede ser medida con un medidor de pH que permite seguir el curso de la reacción.

En la *Tabla 2* se indican varios sistemas de electrodos apropiados para titulaciones potenciométricas.

Realizar las curvas de titulación correspondientes (para una titulación ácido-base, pH en función de los ml de titulante agregado; y para titulaciones por precipitación, complejométricas o de óxido-reducción, los mV en función de los ml de titulante agregado), para obtener una curva sigmoidea con una porción que asciende rápidamente cerca del punto de equivalencia. El punto medio de esta porción vertical lineal o punto de inflexión puede considerarse como punto final. El punto de equivalencia también puede determinarse matemáticamente sin trazar una curva de titulación; sin embargo, se debe tener en cuenta que en reacciones asimétricas el punto final definido por la inflexión de la curva de titulación no ocurre exactamente en el punto de equivalencia estequiométrico. Por lo tanto, la detección potenciométrica del punto final no es apropiada para reacciones asimétricas; como por ej., la reacción de precipitación,

$$2Ag^{+} + CrO_4^{-2}$$

y la reacción de óxido-reducción,

$$5Fe^{+2} + MnO_4^{-}$$

[NOTA: existen dos tipos de tituladores electrométricos automáticos. El primero agrega el titulante automáticamente y registra las diferencias de potencial del electrodo durante el curso de la titulación dando la curva sigmoidea esperada. En el segundo, el agregado de titulante se realiza automáticamente hasta que se alcanza un potencial o pH preseleccionado, que representa el punto final y en ese momento cesa el agregado de titulante].

Correcciones con el blanco - El punto final determinado en una titulación es una estimación del punto de equivalencia de la reacción. La validez de esta estimación depende, entre otros factores, de la naturaleza de las sustancias a titular y de la concentración del titulante. De modo que para aumentar la confiabilidad de la determinación del punto final, resulta necesario realizar una corrección con un blanco apropiado. Tal corrección se realiza generalmente mediante la titulación del blanco, en la cual el procedimiento indicado se repite en cada detalle excepto que la muestra se omite. En estos casos, el volumen real de titulante, equivalente a la sustancia analizada, es la diferencia entre el volumen consumido en la titulación del blanco y el consumido en la titulación de la muestra. El volumen corregido así obtenido se emplea para calcular la cantidad de muestra titulada. Cuando se determina el punto final potenciométricamente, la corrección del blanco es generalmente insignificante.

Tabla 1. Sistemas para titulaciones en medio no acuoso.

Tipo de solvente	**De carácter ácido** (para titulación de bases y sus sales)	**Relativamente neutro** (para titulación diferencial de bases)	**De carácter básico** (para titulación de ácidos)	**Relativamente neutro** (para titulación diferencial de ácidos)
Solvente [1]	Ácido acético glacial Anhídrido acético Ácido fórmico Ácido propiónico Cloruro de sulfurilo	Acetonitrilo Alcoholes Cloroformo Benceno Tolueno Clorobenceno Acetato de etilo Dioxano	Dimetilformamida *n*-butilamina Piridina Etilendiamina Morfolina	Acetona Acetonitrilo Metil etil cetona Metil isobutil cetona Alcohol *ter*-butílico
Indicador	Cristal violeta Rojo de quinaldina *p*-Naftolbenceína Alfazurina 2-G Verde de malaquita	Rojo de metilo Naranja de metilo *p*-Naftolbenceína	Azul de timol Timolftaleína Azo violeta *o*-Nitroanilina *p*-Hidroxiazobenceno	Azo violeta Azul de bromotimol *p*-Hidroxiazobenceno Azul de timol
Electrodos	Vidrio/Calomel Vidrio/Plata/Cloruro de plata Mercurio/Acetato mercúrico	Vidrio/Calomel Calomel/Plata/Cloruro de plata	Antimonio/Calomel Antimonio/Vidrio Antimonio/Antimonio[2] Platino/Calomel Vidrio/Calomel	Antimonio/Calomel Vidrio/Calomel Vidrio/Platino

[1]Los solventes relativamente neutros de baja constante dieléctrica como benceno, tolueno, cloroformo o dioxano pueden emplearse con cualquier solvente ácido o básico para aumentar la sensibilidad del punto final.
[2] En la solución titulante.

Tabla 2. Sistemas de electrododos para titulaciones potenciométricas.

Titulación	Electrodo indicador	Ecuación [1]	Electrodo de referencia	Aplicaciones [2]
Ácido-base	Vidrio	$E = k + 0{,}0591\, pH$	Calomel Plata/cloruro de plata	Titulación de ácidos y bases
Precipitimetría (plata)	Plata	$E = E° + 0{,}0591 \log\left[Ag^{+}\right]$	Calomel (con puente salino de nitrato de potasio)	Titulación con/de plata incluyendo haluros o tiocianatos
Complejometría	Mercurio-mercurio (II)	$E = E° + 0{,}0296 \left(\log k' - pM\right)$	Calomel	Titulación de diversos metales con EDTA, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Al^{+3}, Bi^{+3}
Óxido-reducción	Platino	$E = E + \left(0{,}0591/n\right)\log\left[ox\right]/\left[red\right]$	Calomel o Plata/Cloruro de plata	Titulaciones con arsenito, bromo, cerato, dicromato, hexacianoferrato (III), iodato, nitrito, permanganato y tiosulfato

[1] Forma apropiada de la ecuación de Nernst que describe el sistema de electrodos indicado: k = constante del electrodo de vidrio; k' = constante derivada del equilibrio Hg-Hg (II)-EDTA; M = cualquier metal titulable con EDTA; [ox] y [red] de la ecuación, ox + ne^{-} ↔ red.
[2] La lista es representativa pero no es completa.

TEXTOS DE INFORMACIÓN GENERAL

1005. AGUA CALIDAD FARMACÉUTICA

El agua es la principal materia prima utilizada en la industria farmacéutica. Puede ser empleada como excipiente, en pasos de síntesis, en la manufactura de productos terminados o como agente de limpieza de reactores, equipamiento, materiales de envase primario y otros.

Según el proceso farmacéutico del que se trate, se requerirán distintos grados de calidad de agua. El control de la calidad del agua, incluyendo su calidad microbiológica, es un importante desafío para la industria farmacéutica.

CLASIFICACIÓN Y REQUERIMIENTOS DEL AGUA CALIDAD FARMACOPEA ARGENTINA

Agua Potable

Con la denominación de Agua Potable de suministro público y Agua Potable de uso domiciliario, se entiende la que es apta para la alimentación y uso doméstico: no deberá contener sustancias o cuerpos extraños de origen biológico, orgánico, inorgánico o radiactivo en tenores tales que la hagan peligrosa para la salud. Deberá presentar sabor agradable y ser prácticamente incolora, inodora, límpida y transparente (*Art. 982 – Res MSyAS N°494 del 7.07.94*).

El Agua Potable no está descripta por una monografía de la Farmacopea Argentina pero debe cumplir con los requisitos especificados para *Agua Potable* en *Código Alimentario Argentino. Ley Nacional 18.284/69, Capítulo XII: Bebidas Hídricas, Agua y Agua Gasificada*. Sin embargo, debe analizarse la calidad del Agua Potable en el lugar de manufactura para corroborar su adecuación a los parámetros de calidad establecidos. El agua potable puede ser empleada en la síntesis química y en las primeras etapas de limpieza de los equipos empleados en los procesos farmacéuticos de manufactura a menos que existan requerimientos técnicos específicos o requerimientos de mayor calidad de agua. Es el agua de alimentación definida para la producción de Agua Calidad Farmacopea Argentina.

Agua para Inyectables

El Agua para Inyectables es el agua utilizada para la preparación de formas farmacéuticas de administración parenteral y cualquier otro uso indicado en esta Farmacopea.

Durante la producción y almacenamiento del *Agua para Inyectables* deben tomarse las medidas apropiadas para asegurar un adecuado control y monitoreo del conteo microbiológico de aerobios totales. En condiciones normales, un límite de acción apropiado es un conteo de aerobios viables de 10 microorganismos cada 100 ml, determinados por filtración por membrana.

El Agua para Inyectables debe cumplir con los requisitos especificados en la monografía de *Agua para Inyectables* en esta Farmacopea.

Agua Purificada

El Agua Purificada es el agua para la preparación de todos los medicamentos que no requieran el uso de *Agua para Inyectables* a menos que la monografía del producto especifique otra calidad de agua.

Durante la producción y almacenamiento del *Agua Purificada* deben tomarse las medidas apropiadas para asegurar un adecuado control y monitoreo del conteo microbiológico de aerobios totales. En condiciones normales, un límite de acción apropiado es un conteo de aerobios viables de 100 microorganismos por mililitro, determinados por filtación por membrana.

El Agua Purificada debe cumplir con los requisitos especificados en la monografía de *Agua Purificada* en esta Farmacopea.

CALIDAD DE AGUA SEGÚN EL USO FARMACÉUTICO

La calificación y validación de los sistemas de obtención, almacenamiento y distribución de agua resultan fundamentales para el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación.

La calidad de agua a emplear se determina en función de la naturaleza y del uso especificado del producto final y de la etapa del proceso en la cual el agua es empleada.

A continuación se especifica la calidad de agua requerida según el uso de la misma.

Agua utilizada como excipiente en la formulación final

El agua es el excipiente más comúnmente empleado en la fabricación de productos farmacéuticos y la calidad requerida depende del uso para el cual esté definido el producto final. En esta Farmacopea se distinguen dos grupos: el de productos medicinales estériles y el de productos medicinales no estériles.

Tabla 1. Agua utilizada en la preparación de Productos Medicinales Estériles

Productos	**Calidad de Agua Requerida**
Parenterales	Agua para Inyectables
Oftálmicos	Agua Purficada
Soluciones de Hemofiltración	Agua para Inyectables
Soluciones de Hemodiafiltración	Agua para Inyectables
Soluciones de Irrigación	Agua para Inyectables
Soluciones para Diálisis Peritoneal	Agua para Inyectables
Soluciones para Nebulizar	Agua Purificada
Preparaciones Óticas y Nasales	Agua Purificada
Preparaciones de uso dérmico	Agua Purificada

Tabla 2. Agua utilizada en la preparación de Productos Medicinales no Estériles

Productos	**Calidad de Agua Requerida**
Preparaciones Orales	Agua Purificada
Preparaciones de uso dérmico	Agua Purificada
Preparaciones Óticas y Nasales	Agua Purificada
Preparaciones de uso Vaginal y Rectal	Agua Purificada
Preparaciones de soluciones concentradas para hemodiálisis	Agua Purificada

Tabla 3. Agua utilizada durante la elaboración de productos medicinales que no se encontrará presente en la formulación final

Elaboración	**Calidad de Agua Requerida**
Granulación	Agua Purificada
Recubrimiento de Comprimidos	Agua Purificada
Usada en la formulación previo a una liofilización no estéril	Agua Purificada
Usada en la formulación previo a una liofilización estéril	Agua para Inyectables

Tabla 4. Agua utilizada en el lavado de equipos, envases, insertos, tapas y tapones.

Etapas de limpieza	**Producto**	**Calidad de Agua Requerida**
Iniciales de lavado	No estéril	Agua Potable
Final de lavado	No estéril	Agua Purificada o la misma calidad de agua que se utiliza en la elaboración del producto si es de mayor calidad que el Agua Purificada.
Iniciales de lavado	Estéril	Agua Purificada
Final de lavado	Estéril no parenteral	Agua Purificada o la misma calidad de agua que se utiliza en la elaboración del producto si es de mayor calidad que el Agua Purificada.
Final de lavado	Estéril parenteral	Agua para Inyectables.

1013. BUENAS PRÁCTICAS DE DISPENSACIÓN EN LA FARMACIA OFICINAL COMUNITARIA Y HOSPITALARIA

Consideraciones Generales

Los medicamentos deben ser dispensados solamente por establecimientos habilitados por la autoridad sanitaria competente y cuyas actividades serán inspeccionadas regularmente por la autoridad jurisdiccional

En el ámbito comunitario y hospitalario, los servicios Farmacéuticos comprenden toda gestión que garantice la adquisición, preparación, conservación y dispensación de los medicamentos, ayudando a la sociedad a emplearlos adecuadamente para el uso previsto y en cumplimiento de la legislación vigente.

Este capítulo introduce términos y definiciones que son normas indispensables en el cumplimiento de las condiciones exigidas por las Buenas Prácticas de Dispensación, lo cual constituye una herramienta que permite establecer criterios que abarcan diversos aspectos para la adquisición, preparación, conservación y dispensación de los medicamentos.

Las Buenas Prácticas de Dispensación no son un elemento estático, todo lo contrario, son metodologías de trabajo susceptibles de una actualización continua.

Glosario

Las definiciones dadas a continuación se aplican a los términos empleados en esta norma. Es posible que tengan significados diferentes en otros contextos.

Servicios Farmacéuticos: resultado tangible o intangible de un proceso en el cual se participa en la investigación, preparación, distribución, dispensación, control y utilización de los medicamentos y otros productos para la salud, ofreciendo información y asesoramiento a quienes los prescriben, indican o usan.

Habilitación de la Farmacia: documento legal emitido por la autoridad sanitaria, que establece la autorización del establecimiento y su director técnico.

Dispensación: es el servicio Farmacéutico que consiste en la entrega del medicamento y la información sobre su buen uso y que incluye la interpretación de una receta en los casos que correspondiere.

Persona autorizada: es del Director Técnico Farmacéutico o el Farmacéutico Auxiliar que él designe a los efectos de realizar y/o autorizar la dispensación.

Procedimiento operativo para la dispensación: es el procedimiento escrito que contiene las instrucciones para realizar aquellas operaciones que no necesariamente son específicas de la dispensación.

Farmacovigilancia: es la ciencia y actividades relacionadas con la prevención, conocimiento, detección y evaluación de reacciones adversas y otros posibles problemas relacionados con medicamentos.

Problema relacionado con medicamentos: es cualquier evento indeseable que presenta el paciente en el cual está involucrado el tratamiento farmacológico o se sospecha que lo está y que interfiere de manera real o puede interferir en la evolución deseada del paciente.

Intervención farmacéutica: es la estrategia que incluye procedimientos educativos y/o informativos abordados por el Farmacéutico para intentar resolver un problema relacionado con medicamentos, tendiente a mejorar el resultado clínico del tratamiento farmacológico.

Promoción de la Salud: es el proceso que capacita a las personas para controlar y mejorar su salud.

Educación Sanitaria: es un instrumento que posibilita la promoción de la salud. Es el aprendizaje que supone no sólo la transmisión de información, sino también el fomento de la motivación de las habilidades personales y la autoestima, necesarias para adoptar medidas destinadas a mejorar la salud.

Información: es el asesoramiento brindado para prevenir incompatibilidades o interacciones frente a otros medicamentos y/o alimentos, para lograr el cumplimiento de los objetivos terapéuticos buscados, así como también incluye la consulta o derivación del paciente al profesional que corresponda según su incumbencia.

Servicios orientados al medicamento, materias primas, y productos sanitarios, previos a la dispensación en donde el Farmacéutico garantiza la calidad de los productos que dispensa dando cumplimiento a las siguientes actividades:

Evaluación de la procedencia y adquisición: el Farmacéutico es el responsable de garantizar la calidad y legitimidad de los productos que dispense

siendo éstos adquiridos a través de proveedores debidamente habilitados por la autoridad sanitaria.

El Farmacéutico debe además cooperar en la detección y denuncia de medicamentos ilegítimos y de medicamentos con problemas de calidad o efectividad.

Custodia, almacenamiento y conservación: el Farmacéutico asegurará que las condiciones de almacenamiento y conservación sean las adecuadas en cada caso e instrumentará los mecanismos para detectar las fechas de vencimiento previas a la dispensación. Asimismo el Farmacéutico tendrá bajo su custodia todos los productos acorde a las normativas vigentes.

Descarte, devolución, destrucción: el Farmacéutico evitará la adquisición y dispensación de medicamentos y productos para la salud que presenten modificaciones no indicadas expresamente en sus rótulos y/ o prospectos. Se considera que la detección de cambios en el aspecto físico de los medicamentos o sus envases podría ser evidencia de una posible inestabilidad o alteración en su composición, por lo que se debe observar:

- cambios en caracteres físicos como modificaciones de color u olor, coberturas deterioradas, cápsulas rotas, aparición de precipitados, separación de emulsiones, polvos que no se reconstituyen adecuadamente, entre otros;
- modificaciones en el envase primario como pérdida del contenido del envase, deterioro de su aspecto, adulteraciones de fecha de vencimiento, lote, partida o rótulos.
- modificaciones en el envase secundario, como toda evidencia que permita suponer una mala conservación, fallas de impresión, adulteraciones de fecha de vencimiento, lote o partida, ó rótulos.

Comprobadas estas irregularidades, el Farmacéutico deberá abstenerse de dispensar estos medicamentos y notificar a la autoridad sanitaria competente sobre las anormalidades observadas o sospechadas.

Deberá cumplir con los retiros del mercado indicados por la autoridad sanitaria pertinentes e instrumentará los mecanismos necesarios para la devolución de los medicamentos, materias primas y productos sanitarios, así como la eliminación de los residuos peligrosos, acorde a la legislación vigente.

Preparación de medicamentos magistrales y oficinales: el Farmacéutico es responsable de la preparación de medicamentos magistrales y oficinales, dando cumplimiento a las Normas de Buenas Prácticas de Preparación de Farmacopea Argentina.

1015. BUENAS PRÁCTICAS DE ALMACENAMIENTO, DISTRIBUCIÓN Y TRANSPORTE

El presente documento tiene por objetivo proveer una guía general referente al almacenamiento, distribución y transporte de productos farmacéuticos. En él se describen los procedimientos a seguir de modo de resguardar la integridad, calidad y eficacia de los productos farmacéuticos en todas las etapas de distribución.

ORGANIZACIÓN, PERSONAL, DOCUMENTACIÓN

Los establecimientos deben contar con un organigrama de las personas involucradas en el manejo de medicamentos, donde se especifique las funciones y responsabilidades de cada una de ellas. T odo el personal relacionado con las presentes actividades debe ser calificado y recibir entrenamiento continuo en cuanto a las Buenas Prácticas de almacenamiento, distribución y transporte de productos farmacéuticos.

Deben definirse mediante Procedimientos Operativos Normatizados todas las tareas que directa o indirectamente puedan afectar la calidad de los productos o l a actividad de distribución. Estos procedimientos deben ser aprobados, fechados y firmados por las personas autorizadas.

1- BUENAS PRÁCTICAS DE ALMACENAMIENTO

Las Buenas Prácticas de Almacenamiento son aplicables en todas las circunstancias donde se almacenen productos farmacéuticos a lo largo de la cadena de abastecimiento: desde su elaboración hasta la dispensación al público.

En *Consideraciones Generales,* el apartado *Condiciones de Almacenamiento* proporciona las definiciones referentes a l as temperaturas de almacenamiento.

Monitoreo de las condiciones de almacenamiento. Las mediciones de temperatura deben ser efectuadas y registradas de manera constante y segura con equipos debidamente calibrados.

Áreas de almacenamiento

Las áreas de recepción y expedición deben disponerse de modo de proteger a los productos de condiciones climáticas adversas o de cualquier otro riesgo que pudiera afectar su calidad durante el desarrollo de estas tareas.

Las áreas de almacenamiento deben diseñarse o adaptarse de modo de asegurar condiciones adecuadas, debiendo mantenerse limpias y secas. Deben presentar superficies lisas y de fácil limpieza, sin desprendimiento de polvo y poseer protecciones para evitar el ingreso de insectos, aves y roedores.

La limpieza de los locales debe ser guiada por Procedimientos Operativos Normatizados, los cuales indiquen la frecuencia y métodos de limpieza. También debe contarse con un programa escrito en cuanto al control de plagas, teniendo en cuenta que los agentes empleados sean seguros y no impliquen riesgo de contaminación para los productos farmacéuticos almacenados. Deben poseerse Procedimientos Operativos Normatizados para actuar en casos de roturas o derrames, que contemplen la adecuada protección de las personas involucradas y la completa remoción de cualquier riesgo de contaminación. T odas estas operaciones deben ser convenientemente registradas.

Los productos deben estibarse evitando el contacto directo con el piso y la incidencia de la luz solar directa. L as áreas de almacenamiento deben poseer capacidad suficiente para permitir la estiba ordenada y racional de varias categorías de productos. D ebe contarse con áreas segregadas y claramente identificadas para la estiba de productos rechazados, devueltos, vencidos y retiros del mercado.

Los productos que presenten especial riesgo de explosión o i ncendio (aerosoles, líquidos combustibles, etc) deben estibarse en áreas exclusivas sujetas a medidas apropiadas de seguridad.

Los psicotrópicos y estupefacientes deben almacenarse de acuerdo a lo establecido en la normativa vigente.

Los equipos frigoríficos deben tener capacidad suficiente para permitir la circulación de frío entre los diversos embalajes, contar con un sistema de alarma confiable que indique rápidamente cualquier tipo de anomalía en su funcionamiento y en lo posible poseer una red alternativa de energía.

2- BUENAS PRÁCTICAS DE DISTRIBUCIÓN Y TRANSPORTE

La cadena de distribución comprende exclusivamente a los establecimientos autorizados para comercializar productos farmacéuticos, debiéndose solicitar y archivar previo al despacho la documentación que lo acredite.

Las actividades de distribución deben ser guiadas por Procedimientos Operativos Normatizados y registros que permitan la rastreabilidad de los productos. Dichos registros deben contener al menos la siguiente información: identificación del producto, número de lote, fecha de vencimiento, cantidades,

nombre y dirección del destinatario, número del documento de despacho y datos del transporte. Los medicamentos en tránsito deben ser acompañados por la documentación que acredite su procedencia y legitimidad.

Deben existir cronogramas de entrega y la carga dentro de los vehículos debe realizarse respetando que ingrese primero lo último en ser distribuido, de modo de disminuir el tiempo de la mercadería en circulación y evitar daños fisicos.

Es recomendable la utilización de vehículos exclusivos para el transporte de medicamentos. En caso de que esto no sea factible, los medicamentos no podrán compartir carga con mercadería que comprometa la calidad de los productos farmacéuticos.

Los vehículos deben encontrarse en buenas condiciones técnicas y contar con capacidad suficiente para permitir la estiba ordenada de los productos.

Deben realizarse tareas de limpieza y control de plagas sobre las unidades de transporte, orientadas por Procedimientos Operativos Normatizados, que indiquen la frecuencia y métodos utilizados, contando con registros escritos que lo documenten.

Las condiciones de almacenamiento requeridas para los productos farmacéuticos deben mantenerse dentro de límites aceptables durante el transporte. La temperatura dentro de los vehículos debe ser monitoreada de manera de detectar y corregir desviaciones groseras o por períodos prolongados de las especificadas para los productos. D icho monitoreo debe realizarse según Procedimientos Operativos Normatizados, mediante dispositivos debidamente calibrados y registro de los datos obtenidos.

1020. BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN PARA ELABORADORES, IMPORTADORES / EXPORTADORES DE MEDICAMENTOS

CONTENIDO

GLOSARIO GENERAL

PARTE I

BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN PARA ELABORADORES, IMPORTADORES/EXPORTADORES DE MEDICAMENTOS

CAPITULO 1 - GESTIÓN DE CALIDAD
- Principio
- Aseguramiento/Garantía de la Calidad
- Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos (BPF)
- Control de Calidad
- Revisión de la Calidad del Producto
- Gestión de Riesgos para la Calidad

CAPITULO 2 - PERSONAL
- Principio
- Consideraciones Generales
- Personal Responsable
- Capacitación
- Higiene del Personal

CAPITULO 3 – LOCALES Y EQUIPAMIENTO
- Principio
- Locales
- Equipamiento

CAPITULO 4 – DOCUMENTACIÓN
- Principio
- Consideraciones Generales
- Documentos Necesarios
- Formula Maestra de Elaboración e Instrucciones de Fabricación
- Instrucciones de Acondicionamiento
- Registro de Lote
- Registros de Acondicionamiento de Lote
- Procedimientos y Registros

CAPITULO 5 – PRODUCCIÓN
- Principio
- Consideraciones Generales
- Prevención de la Contaminación Cruzada en la Producción
- Validación
- Materiales de Partida
- Operaciones de Fabricación – Productos Intermedios y a Granel
- Materiales de Acondicionamiento
- Operaciones de Acondicionamiento
- Productos Terminados
- Materiales Rechazados, Recuperados y Devueltos

CAPITULO 6 – CONTROL DE CALIDAD
- Principio
- Consideraciones Generales
- Buenas Prácticas de Laboratorio de Control de Calidad
- Documentación
- Muestreo
- Análisis
- Programa de Seguimiento de Estabilidad de Productos en el Mercado

CAPITULO 7 – ELABORACIÓN Y ANALISIS POR CONTRATO
- Principio
- Consideraciones Generales
- El Contratante
- El Contratado
- El Contrato

CAPITULO 8 – RECLAMO Y RETIRO DE PRODUCTOS
- Principio
- Reclamo
- Retiro de Producto

CAPITULO 9 - AUTOINSPECCION
- Principio

ANEXOS

ANEXO 1 - ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS ESTÉRILES

ANEXO 2 - ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS BIOLÓGICOS DE USO HUMANO

ANEXO 3 - BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE PREPARACIONES RADIOFARMACÉUTICAS

ANEXO 4 - APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE PELIGROS Y PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL EN LA PRODUCCIÓN DE MEDICAMENTOS

ANEXO 5 - RECOMENDACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD – BIOEQUIVALENCIA. ETAPA ANALÍTICA

ANEXO 6 - BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE GASES MEDICINALES

ANEXO 7 - BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE PRODUCTOS FITOTERÁPICOS

ANEXO 8 - MUESTREO DE MATERIALES DE PARTIDA Y DE ACONDICIONAMIENTO

ANEXO 9 - ELABORACIÓN DE LÍQUIDOS Y SEMISÓLIDOS

ANEXO 10 - ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS PARA INHALACIÓN EN AEROSOL PRESURIZADO CON DOSIFICADOR

ANEXO 11 - SISTEMAS INFORMÁTICOS

ANEXO 12 - USO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LA ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS

ANEXO 13 - ELABORACIÓN DE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS DE INVESTIGACIÓN

ANEXO 14 - ELABORACIÓN DE PRODUCTOS DERIVADOS DE SANGRE Y PLASMA HUMANO

ANEXO 15 - CALIFICACIÓN Y VALIDACIÓN

ANEXO 16 - NORMAS PARA LA IDENTIFICACIÓN POR COLORES DE ENVASES DE LAS DROGAS DE USO ANESTESIOLÓGICO Y DE LAS SOLUCIONES PARENTERALES

ANEXO 17 - LIBERACION PARAMÉTRICA

ANEXO 18 - MUESTRAS DE RETENCIÓN

PARTE II

BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE INGREDIENTES FARMACÉUTICOS ACTIVOS

1. INTRODUCCIÓN
2. GERENCIA DE CALIDAD
3. PERSONAL
4. EDIFICIOS E INSTALACIONES (SERVICIOS DE SOPORTE)
5. EQUIPAMIENTO DE PRODUCCIÓN
6. DOCUMENTACIÓN Y REGISTRO
7. MANEJO DE MATERIALES
8. PRODUCCION Y CONTROLES EN PROCESO
9. ENVASADO Y ROTULADO IDENTIFICATORIO DE IFAS E INTERMEDIARIOS
10. ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN
11. CONTROLES DE LABORATORIO
12. VALIDACIÓN
13. CONTROL DE CAMBIOS
14. RECHAZO Y REUTILIZACIÓN DE MATERIALES
15. RECLAMOS Y RETIRO DEL MERCADO
16. ELABORACIÓN Y/O ANÁLISIS POR CONTRATO
17. AGENTES, CORREDORES, COMERCIANTES, DISTRIBUIDORES, Y REACONDICIONADORES
18.- GUÍA ESPECÍFICA PARA IFAS FABRICADAS POR CULTIVO/FERMENTACIÓN CELULAR
19. IFAs PARA USO EN ENSAYOS CLINICOS

GLOSARIO

GLOSARIO GENERAL

Las definiciones expresadas a continuación se aplican a los términos utilizados en esta norma y pueden tener un significado diferente en otro contexto.

Acondicionamiento - Todas las operaciones, incluyendo el llenado y rotulado, que debe atravesar un producto a granel a fin de convertirse en un producto terminado.

Nota: El llenado estéril no se considera parte del acondicionamiento, por ser el producto a granel el envase primario llenado, pero no finalmente acondicionado.

Agentes biológicos - Microorganismos, incluyendo los obtenidos mediante ingeniería genética, cultivos de células y endoparásitos, ya sean patógenos o no.

Área contenida - Área construida y operada (y equipada con el manejo de aire y filtración apropiados) a fin de evitar la contaminación desde el entorno externo con agentes biológicos que se encuentran dentro del área.

Área controlada - Área construida y operada a fin de intentar controlar la introducción de contaminación potencial (un suministro de aire que se aproxime al grado D puede ser apropiado) y las consecuencias de una liberación accidental de organismos vivos. El nivel de control debe corresponderse con la naturaleza del organismo empleado en el proceso. Como mínimo, el área se

debe mantener a una presión negativa al entorno exterior inmediato y debe permitir la eficiente eliminación de pequeñas cantidades de contaminantes aéreos.

Área limpia - Área con un control ambiental definido de contaminación de partículas y microbiana, construida y utilizada de tal manera que se reduce la introducción, generación y retención de los contaminantes dentro del área.

NOTA: los diferentes grados de control ambiental se definen en el Anexo 1 “Elaboración de Medicamentos Estériles”.

Área limpia/contenida - Área construida y operada de tal manera que alcanza los objetivos de un área tanto limpia como contenida al mismo tiempo.

Área segregada - Área separada con acceso restringido.

Banco de células - Sistema de banco de células: sistema por el que se elaboran lotes sucesivos de un producto mediante cultivos en las células derivadas del mismo banco de células maestro (completamente caracterizado en función de la identidad y ausencia de contaminación). Se emplea un número de envases del banco de células maestro para preparar un banco de células de trabajo. El sistema de banco de células se valida para un nivel de paso o número de duplicaciones de población que excede el alcanzado en la producción de rutina.

Banco de células maestro: cultivo celular (completamente caracterizado) distribuido en contenedores en una única operación, procesado juntamente de tal manera que se asegura la uniformidad y se lo almacena de tal manera que se asegura la estabilidad. Por lo general, un banco de células maestro se almacena a -70 °C o menos.

Banco de células de trabajo: cultivo celular derivado del banco de células maestro y pretendido para utilizar en la preparación de cultivos celulares de producción. Por lo general, un banco de células de trabajo se almacena a – 70 °C o menos.

Biogenerador - Sistema cerrado, como un fermentador, en el que se introducen agentes biológicos junto con otros materiales, a fin de hacer efectiva su multiplicación o la producción de otras sustancias mediante reacción con los otros materiales. Por lo general, los biogeneradores cuentan con dispositivos de regulación, control, conexión, adición y extracción de material.

Calibración - Conjunto de operaciones que, bajo condiciones especificadas, establece la relación entre los valores indicados por un aparato o sistema de medición o valores representados por una medición de material y los valores correspondientes conocidos de un estándar de referencia.

Calificación - Acción que prueba que cualquier equipamiento a sido diseñado, construido, instalado y opera correctamente conduciendo a los resultados esperados en forma consistente. A veces, se amplía el término validación para incluir el concepto de calificación.

Capacitación - Entrenamiento general y específico que recibe el personal para desarrollar las tareas asignadas.

Cilindro - Recipiente diseñado para contener gas a alta presión.

Conciliación - Comparación, que contempla la variación normal, entre la cantidad de un producto o material elaborado o utilizado teórica y realmente.

Contaminación cruzada - Contaminación de una materia prima o de un producto con otra materia prima o producto.

Contención - Acción de confinar un agente biológico u otra entidad dentro de un espacio definido.

Contención primaria: sistema de contención que evita el escape de un agente microbiológico al entorno de trabajo inmediato. Comprende el uso de contenedores cerrados o gabinetes de seguridad biológica conjuntamente con procedimientos operativos seguros.

Contención secundaria: sistema de contención que evita el escape de un agente microbiológico al entorno externo o a otras áreas de trabajo. Comprende el uso de salas con manejo de aire especialmente diseñado, la existencia de esclusas y/o esterilizadores para el egreso de materiales, como así también procedimientos operativos seguros. En muchos casos, puede contribuir a la efectividad de la contención primaria.

Control en proceso - Controles efectuados durante la producción a fin de monitorear y, de ser necesario, ajustar el proceso para asegurar que el producto cumple con su especificación. El control del entorno o equipamiento también debe considerarse como parte del control en proceso.

Control de calidad - Ver capítulo 1.

Cuarentena - Condición de la materia prima o material de acondicionamiento, producto

intermedio, a granel o terminado aislado de manera física o mediante otros medios efectivos, mientras se aguarda una determinación sobre su liberación o rechazo.

Cultivo celulares - Resultado del crecimiento in vitro de células aisladas de organismos multicelulares.

Devolución - Entrega al elaborador o distribuidor de un producto farmacéutico, presente éste o no un defecto de calidad.

Elaboración - Todas las operaciones de adquisición de materiales y productos, Producción, Control de Calidad, liberación, almacenaje, distribución de productos farmacéuticos y los respectivos controles.

Esclusa - Espacio cerrado con dos o más puertas y que se interpone entre dos o más áreas, por ej. de distintos tipos de limpieza, con el fin de controlar la circulación de aire entre dichas áreas . Una esclusa es diseñada para ser utilizada tanto por personas como por productos.

Especificación - Ver Capítulo 4.

Esterilidad - Esterilidad es la ausencia de organismos vivos. Las condiciones de las evaluaciones de esterilidad se especifican en la Farmacopea Europea y otras farmacopeas pertinentes.

Fórmula maestra - Documento o conjunto de documentos que especifican las materias primas y los materiales de acondicionamiento con sus cantidades para producir una cantidad específica de un producto terminado.

Orden de fabricación - Descripción de los procedimientos, instrucciones de elaboración y precauciones requeridos para producir una cantidad específica de un producto terminado, incluyendo los controles en proceso.

Gases licuables - Gases que, a una temperatura y presión normal de llenado, permanecen en estado líquido en el cilindro.

Infectado - Contaminado con agentes biológicos extraños y, por tanto, capaces de diseminar una infección.

Límite de acción - Criterios establecidos que requieren una acción correctiva inmediata.

Límite de alerta - Indicadores establecidos que alertan sobre un potencial desvío de las condiciones normales, que no necesariamente constituyen motivo de acción correctiva, pero que requieren investigación de seguimiento.

Lote - Cantidad definida de materia prima, material de acondicionamiento o producto procesado en un proceso o serie de procesos de tal manera que se pueda esperar su homogeneidad.

NOTA: para completar ciertas etapas de fabricación puede ser necesario dividir el lote en sublotes, que luego se unen para conformar un lote homogéneo. En el caso de fabricación continua, el lote debe corresponder a una fracción definida de la producción, caracterizado por su homogeneidad pretendida.

Para el control del producto terminado, un lote de productos farmacéuticos comprende todas las unidades de la forma farmacéutica que se elabora de la misma masa inicial de material y que atravesó una única serie de operaciones de elaboración o una única operación de esterilización o, en el caso de procesos de producción continua, todas las unidades elaboradas en un período de tiempo dado.

Lote Semilla - Sistema de lote semilla - Sistema por el cual lotes sucesivos de un producto derivan del mismo lote semilla maestro a un nivel de pasaje dado. Para la producción de rutina, se prepara un lote semilla de trabajo a partir del lote semilla maestro. El producto final deriva del lote semilla de trabajo y no atraviesa más pasajes desde el lote semilla maestro que la vacuna que en los estudios clínicos demostró seguridad y eficacia satisfactorias. Se deberá registrar el origen y el historial de pasaje del lote de semilla maestro y del lote semilla de trabajo.

Lote semilla Maestro: cultivo de un microorganismo distribuido desde un único granel a envases mediante una única operación, de tal manera que se asegure la uniformidad, para evitar la contaminación y asegurar la estabilidad. Un lote semilla maestro en forma líquida se almacena a o menos de -70ºC. Un lote semilla maestro secado por congelación se almacena a una temperatura que asegure la estabilidad.

Lote semilla de trabajo: cultivo de un microorganismo derivado del lote semilla maestro y destinado al uso en la producción. Los lotes de semilla de trabajo se distribuyen en contenedores y se almacenan según la descripción para los lotes semilla maestros.

Materiales - Insumos que incluyen materias primas, envases primarios y secundarios, rótulos o etiquetas, gases, solventes, excipientes y reactivos

Materia prima - Cualquier sustancia utilizada en la elaboración de un producto farmacéutico, excluyendo los materiales de acondicionamiento.

Material de acondicionamiento - Cualquier material empleado en el acondicionamiento de un medicamento, excluyendo cualquier empaque exterior utilizado en el transporte o envío. Los materiales de acondicionamiento se dividen en primarios o secundarios dependiendo de su contacto directo o no con el producto.

Medicamento - Toda preparación o producto farmacéutico empleado para la prevención, diagnostico y/o tratamiento de una enfermedad o estado patológico, o para modificar sistemas fisiológicos en beneficio de la persona a quien se le administra.

Número de lote - Combinación de número y/o letras distintiva que específicamente identifica un lote.

Organismo exótico - Agente biológico cuya enfermedad correspondiente no existe en un país o área geográfica dada o cuya enfermedad es objeto de medidas profilácticas o de un programa de erradicación emprendido en dicho país o área geográfica.

Operación simulada (Media Fill) - Método de evaluación del proceso de llenado aséptico usando un medio de cultivo de crecimiento microbiano.

Persona autorizada - Persona/s calificada/s a la/s cual/es el responsable técnico le/s ha delegado la función de liberación/aprobación de materiales o productos. Sin embargo, el responsable técnico sigue manteniendo la responsabilidad ante la Autoridad Sanitaria

Persona calificada - Persona con antecedentes y experiencia científico técnica que recibe entrenamiento y evaluación para realizar la función que se le asigna

Planta cruda (droga vegetal) - Planta medicinal fresca o seca o partes de la misma.

Planta medicinal - Planta que en su totalidad o en parte se utiliza con fines farmacéuticos.

Procedimientos - Descripción de las operaciones a desarrollarse, precauciones a tomarse y medidas a ser aplicadas directa o indirectamente en relación a la elaboración de un producto farmacéutico.

Producto terminado - Medicamento expuesto a todas las etapas de elaboración incluyendo el acondicionamiento en su envase final.

Productos fitoterapéuticos - Productos farmacéuticos que contienen como ingredientes activos, exclusivamente material de plantas y/o preparaciones de drogas vegetales.

Producto a granel - Cualquier producto que haya completado todas las etapas de procesamiento hasta, pero no inclusive, el acondicionamiento final.

Producto intermedio - Material parcialmente procesado que debe atravesar más pasos de elaboración antes de convertirse en un producto a granel.

Producción - Todas las operaciones realizadas en la preparación de un medicamento, desde la recepción de materiales, pasando por el procesamiento y acondicionamiento hasta su finalización como producto terminado.

Responsable Técnico - Persona reconocida por la Autoridad Sanitaria como poseedora de antecedentes y experiencia científico-técnica necesaria para asumir esa responsabilidad en la empresa.

Recipiente criogénico - Recipiente diseñado para contener gas licuado a una temperatura extremadamente baja.

Recuperación - Introducción parcial de lotes anteriores, de la calidad requerida, en otro lote en una etapa definida de la elaboración.

Radiofármaco - Cualquier medicamento que, cuando está listo para usar, contiene uno o más radionúclidos (isótopos radioactivos) incluidos con un fin farmacéutico.

Registro - Ver Capítulo 4.

Reproceso - Re-trabajo parcial o total de un lote de producto de una calidad inaceptable de una etapa definida de elaboración, a fin de que su calidad se pueda considerar aceptable mediante una o más operaciones adicionales.

Sistema informático - Sistema que incluye el ingreso de datos, procesamiento electrónico y la obtención de información utilizada, ya sea, para un informe o para el control automático.

Válvula distribuidora - Equipamiento o aparato diseñado para permitir que uno o más contenedores de gas se llenen simultáneamente desde la misma fuente.

Validación - Acción de probar, de acuerdo con los principios de las Buenas Prácticas de Fabricación, que cualquier procedimiento, proceso,

actividad o sistema, realmente, conducen a los resultados esperados (ver también calificación).

PARTE I

CAPÍTULO 1

GESTIÓN DE CALIDAD

PRINCIPIO - El titular de una habilitación de elaboración debe fabricar productos farmacéuticos de manera tal que asegure que son aptos para el uso pretendido, que cumplan con los requisitos de la Autorización de Comercialización y que no presenten riesgo alguno para los pacientes a causa de una inadecuada seguridad, calidad o eficacia. Alcanzar este objetivo de calidad es responsabilidad de la dirección y requiere la participación y el compromiso por parte del personal de distintos departamentos y niveles dentro de la compañía, como de los proveedores y distribuidores.

A los efectos de alcanzar los objetivos de calidad de manera confiable, debe existir un sistema de calidad completamente diseñado de forma lógica y y correctamente implementado, que incorpore las Buenas Prácticas de Fabricación como así también, el Control de Calidad y la Gestión de Riesgos para la calidad. Debe estar completamente documentado y debe controlarse su eficacia. Todos los componentes de los sistemas de Calidad deben contar con personal competente, como así también locales, equipamiento e instalaciones adecuadas y suficientes.

El titular de de una habilitación de elaboración así como el responsable técnico tienen responsabilidades legales adicionales

Los conceptos básicos de Aseguramiento de la Calidad, Buenas Prácticas de Fabricación, Control de Calidad y Gestión de Riesgos están interrelacionados. A continuación se describen dichos conceptos con el fin de mostrar su relación y su importancia en la producción y el control de medicamentos.

Aseguramiento/garantía de la calidad

1.1. El Aseguramiento de la Calidad es un concepto amplio que comprende todas las cuestiones que individual o colectivamente afectan la calidad de un producto. Representa el conjunto de medidas adoptadas con el objeto de de garantizar que los medicamentos son de la calidad requerida para el uso al que están destinados. El Aseguramiento de la Calidad incorpora, por lo tanto, las Buenas Prácticas de Fabricación pero también otros factores que están fuera del alcance de esta normativa.

El sistema de Aseguramiento de la Calidad apropiado para la fabricación de medicamentos debe garantizar que:

a) los medicamentos se diseñan y elaboran teniendo en cuenta los requisitos de las Buenas Prácticas de Fabricación;

b) las operaciones de producción y control se describen claramente y se adoptan las Buenas Prácticas de Fabricación;

c) las responsabilidades de los puestos directivos se especifican claramente

d) se realicen las gestiones para la elaboración, suministro y uso de materias primas y materiales de acondicionamiento correctos;

e) se lleven a cabo todos los controles sobre los productos intermedios así como los controles en proceso y las validaciones

f) el producto terminado se fabrica y se controla correctamente, según procedimientos definidos.

g) ningún medicamento se vende o se suministra sin que previamente el responsable técnico o una persona autorizada por él haya certificado que cada lote de fabricación se ha elaborado y controlado de acuerdo con los requisitos de la Autorización de Comercialización y cualquier otra disposición relativa para la producción, control y liberación de medicamentos;

h) se adoptan las medidas necesarias para asegurar, en la medida de lo posible, que el producto farmacéutico se almacene, distribuya y, posteriormente, se manipule de tal forma que la calidad se mantenga íntegra durante toda su vida útil;

i) exista un procedimiento de autoinspecciones y/o de auditorías de calidad que periódicamente evalúe la eficacia y la aplicación del sistema de Aseguramiento de Calidad.

Buenas prácticas de fabricación de medicamentos (BPF)

1.2. Las Buenas Prácticas de Fabricación constituyen la parte del Aseguramiento de la Calidad que asegura que los productos farmacéuticos son consistentemente producidos y controlados con estándares de calidad para el uso pretendido y según los requisitos de la autorización de comercialización y las especificaciones del producto.

Las Buenas Prácticas de Fabricación se relacionan tanto con la producción como con el

control de calidad. Los requisitos básicos de las BPF son:

a) Que todos los procesos de elaboración estén claramente definidos, sistemáticamente revisados en función de la experiencia adquirida y que los procedimientos aplicados demuestren ser capaces de fabricar en forma consistente productos farmacéuticos de la calidad requerida, cumpliendo con sus especificaciones;

b) Que se validan los pasos críticos del proceso de fabricación y los cambios significativos en él efectuados;

c) Que se proporcionan todos los recursos necesarios para el cumplimiento de las BPF incluyendo:

I) personal adecuadamente calificado y capacitado;
II) locales y espacio adecuados;
III) equipamiento y servicios apropiados;
IV) materiales, envases y etiquetas correctos;
V) procedimientos e instrucciones aprobados;
VI) almacenamiento y transporte adecuados.

d) Que las instrucciones y procedimientos tengan un formato establecido por la empresa y se redacten en un lenguaje claro y sin ambigüedades, siendo específicamente aplicables a las instalaciones provistas;

e) Que se capacite al personal para llevar a cabo correctamente los procedimientos;

f) que se lleven registros, de la fabricación de forma manual y/o a través de otros medios, de tal modo que se demuestre que todos los pasos descritos en los procedimientos e instrucciones se han seguido y que la cantidad y calidad del producto es la esperada. Cualquier desviación significativa debe registrarse e investigarse completamente.

g) Que los registros de la fabricación incluyendo la distribución, permitan la trazabilidad completa del lote en forma detallada, y se conserven en forma accesible;

h) Que durante la distribución de los productos se reduzca al mínimo cualquier riesgo para la calidad de los mismos;

i) Que se disponga de un sistema para retirar del mercado cualquier lote de producto, ya sea de la venta o en cualquier etapa de la distribución;

j) Que se estudien los reclamos sobre los productos comercializados, y que se investiguen las causas de los defectos de calidad tomando medidas apropiadas a fin de prevenir que se repitan y no solamente en lo que se refiere al defecto del producto.

Control de calidad

1.3. El Control de Calidad constituye la parte de las Buenas Prácticas de Fabricación relacionada con el muestreo, especificaciones y ensayos, y con, la organización, documentación y procedimientos de liberación que aseguran que los análisis necesarios y pertinentes son realmente llevados a cabo y que los materiales no se liberen para su uso, ni los productos se liberen para la venta o la distribución, hasta que su calidad sea juzgada como satisfactoria.

Los requisitos básicos del Control de Calidad son:

a) Que se disponga de instalaciones adecuadas, personal capacitado y procedimientos aprobados para el muestreo, inspección y control de materia prima, materiales de acondicionamiento, productos intermedios, a granel y terminados y, donde corresponda, para el monitoreo de las condiciones ambientales en lo que al cumplimiento de las BPF se refiere.

b) Que las materias primas, materiales de acondicionamiento, productos intermedios, a granel y terminados sean muestreados por personal y métodos aprobados por Control de Calidad;

c) Que los métodos analíticos estén validados;

d) Que se lleven registros, en forma manual y/o a través de otros medios, que demuestren que realmente se han llevado a cabo los procedimientos requeridos de muestreo, inspección y control. Cualquier desviación significativa debe registrarse e investigarse completamente.

e) Que los productos terminados contengan ingredientes activos que cumplan con la composición cualitativa y cuantitativa de la Autorización de Comercialización, que sean de la pureza requerida, se encuentren en el envase correspondiente y estén correctamente rotulados;

f) Que se registren los resultados de los controles analíticos y que la evaluación de materiales, productos intermedios, a granel y terminados se evalúen formalmente teniendo en cuenta sus especificaciones. La evaluación del producto incluye una revisión y evaluación de la documentación de la producción como así también una evaluación de los desvíos de los procedimientos especificados;

g) Que ningún lote de producto se libere para la venta o distribución antes de que el responsable técnico o una persona autorizada por él certifique que cumple con los requisitos de la Autorización de Comercialización;

h) Que se conserven suficientes muestras de materias primas y de productos para poder realizar, en caso de necesidad, controles futuros y que el producto se conserve en su envase final a menos que los envases sean excepcionalmente grandes.

Revisión de la calidad del producto

1.4. Se deben realizar revisiones de calidad regulares periódicas o continuas de todos los medicamentos comercializados, incluyendo aquellos productos destinados exclusivamente a la exportación, con el objetivo de verificar la consistencia de los procesos existentes y si son adecuadas las especificaciones actuales tanto de las materias primas como de los productos terminados, a los efectos de destacar cualquier tendencia e identificar las mejoras en los productos y procesos. Tales revisiones se deben desarrollar y documentar por lo general anualmente, teniendo en cuenta las revisiones previas y deben incluir al menos:

a) Una revisión de los materiales de partida, incluyendo materiales de acondicionamiento utilizados para el producto, especialmente los provenientes de nuevas procedencias;

b) Una revisión de los controles críticos de proceso y de los resultados de los controles de producto terminado;

c) Una revisión de los lotes no conformes con las especificaciones establecidas y su investigación correspondiente;

d) Una revisión de todos los desvíos significativos y de las no conformidades, sus investigaciones y la eficacia de las medidas correctivas y preventivas adoptadas.

e) Una revisión de los cambios realizados en los procesos o métodos analíticos.

f) Una revisión de las modificaciones de la Autorización de Comercialización presentadas, concedidas o denegadas incluyendo las correspondientes a los productos destinados exclusivamente a la exportación.

g) Una revisión de los resultados del programa de estabilidad en curso y cualquier tendencia adversa.

h) Una revisión de las devoluciones, reclamos y retiros/corrección del mercado relacionados con la calidad y de las investigaciones realizadas;

i) Una revisión de cualquier otra medida correctiva anteriormente adoptadas en los equipos o procesos de producción;

j) Una revisión de los compromisos posteriores a la comercialización, sólo en el caso de nuevas autorizaciones de comercialización o de modificaciones de la misma;

k) El estado de calificación del equipamiento y servicios de apoyo pertinentes, tales como sistemas de tratamiento de aire, sistemas de producción y distribución de agua, gases comprimidos, entre otros;

l) Una revisión de los convenios tal y como los define el capítulo 7, con el fin de garantizar que están actualizados;

El fabricante y el titular de la autorización de comercialización, si difieren, deben evaluar los resultados de esta revisión y valorar la necesidad de adoptar medidas correctivas o preventivas, o bien, de realizar una revalidación. Los motivos de tales acciones correctivas deben documentarse. Las acciones correctivas y preventivas que se acuerden deben completarse a tiempo y de forma efectiva. Los procedimientos deben describir la gestión y revisión de estas acciones y la eficacia de estos procedimientos debe verificarse durante las autoinspecciones. Las revisiones de calidad pueden agruparse por tipo de producto, por ejemplo, formas farmacéuticas sólidas, líquidas, productos estériles, entre otros, con justificación científica.

Cuando el titular de la autorización de comercialización difiere del fabricante, debe haber un acuerdo técnico/convenio entre las partes que defina las responsabilidades respectivas en la revisión de la producción. El titular de la autorización de comercialización debe asegurar que la revisión de calidad se efectúe a tiempo y de manera precisa.

Gestión de riesgos para la calidad

1.5. La gestión de riesgos para la calidad es un proceso de evaluación, control, comunicación y revisión de los riesgos que afectan a la calidad de un medicamento que se realiza sistemáticamente. Se puede aplicar de forma tanto prospectiva como retrospectiva.

1.6. El sistema de gestión de riesgos para la calidad debe garantizar que:

- la evaluación de todo riesgo para la calidad se basa en el conocimiento científico y en la experiencia adquirida en los procesos; la evaluación debe estar ligada en última instancia a la protección de los pacientes;
- el nivel de esfuerzo, de detalle y de documentación formal que suponga el proceso de gestión de riesgos para la calidad está estrechamente relacionado con el nivel del riesgo.

CAPÍTULO 2

PERSONAL

PRINCIPIO - El establecimiento y el mantenimiento de un sistema de Aseguramiento de la Calidad y la correcta fabricación de medicamentos dependen de las personas. Por esta razón, debe existir suficiente personal calificado para realizar todas las tareas que corresponden al elaborador. Cada persona debe comprender claramente que responsabilidades le son atribuidas y estas responsabilidades deberán figurar en instrucciones escritas. Todo el personal debe conocer las normas de BPF que le afecten y debe recibir la capacitación inicial y continua, incluyendo instrucciones de higiene relevantes para sus necesidades.

Consideraciones generales

2.1. El elaborador debe poseer una cantidad adecuada de personal con las calificaciones y experiencia práctica necesarias. Las responsabilidades asignadas a un individuo no deben ser excesivas como para presentar riesgos a la calidad.

2.2. El elaborador debe disponer de un organigrama. El personal que ejerza cargos de responsabilidad debe tener una descripción formal de las tareas específicas y la debida autoridad para desempeñar sus funciones. Estas tareas pueden delegarse en otras personas con un nivel satisfactorio de calificación, pero la responsabilidad no es delegable. No deben existir brechas ni superposiciones inexplicables en las responsabilidades del personal relacionado con la aplicación de las Buenas Prácticas de Fabricación.

Personal responsable

2.3. El personal responsable incluye al jefe de Producción, jefe de Control de Calidad y si, al menos, una de estas personas no es responsable de la liberación de productos, la(s) persona(s) designada(s) a tal fin. Por lo general, los puestos clave deben estar ocupados por personal de tiempo completo. Los jefes de Producción y Control de Calidad deben ser independientes entre sí. En grandes organizaciones, puede ser necesario delegar las funciones enumeradas en 2.4., 2.5. y 2.6.

2.4. Generalmente, el jefe del Departamento de Producción tiene las siguientes responsabilidades:

a) Asegurar que los productos se elaboren y almacenen de acuerdo con la documentación apropiada a fin de obtener la calidad requerida;
b) Aprobar las instrucciones relacionadas con las operaciones de producción y asegurar su estricta implementación;
c) Asegurar que una persona calificada evalúe y firme los registros de producción antes de enviarlos al Departamento de Control de Calidad;
d) Verificar el mantenimiento de su departamento, instalaciones y equipamiento;
e) Asegurar que se realicen las validaciones adecuadas;
f) Asegurar que la capacitación inicial y continua del personal de su departamento se desarrolle según las necesidades y se adapte a las mismas.

2.5. Por lo general, el jefe del Departamento de Control de Calidad tiene las siguientes responsabilidades:

a) Aprobar o rechazar, según corresponda, los materiales de partida, material de acondicionamiento y productos intermedios, a granel y terminados;
b) Evaluar los protocolos de cada lote;
c) Garantizar que se se realizan todas las pruebas necesarias;
d) aprobar las especificaciones, instrucciones de muestreo, métodos analíticos y procedimientos de Control de Calidad;
e) Aprobar y controlar los análisis por contrato;

f) Verificar el mantenimiento de las instalaciones y equipamiento de su departamento;

g) Garantizar que se realicen las validaciones necesarias;

h) Garantizar que se lleve a cabo la capacitación inicial y continua del personal de su departamento y que dicha formación sea adecuada a sus necesidades.

En el Capítulo 6 se mencionan otras responsabilidades del Departamento de Control de Calidad.

2.6. Por lo general, los jefes de Producción y de Control de Calidad poseen algunas responsabilidades compartidas o conjuntas relacionadas con la calidad. Éstas pueden incluir, en relación con las disposiciones nacionales:

d) La autorización de procedimientos escritos y otros documentos incluyendo sus modificaciones;

e) Seguimiento y control de las condiciones ambientales de la fabricación;

f) Higiene industrial;

g) La validación de proceso;

h) La capacitación;

i) La aprobación y el control de los proveedores de materiales;

j) La aprobación y el control de elaboradores contratados;

k) La designación y el control de las condiciones de almacenamiento de materiales y productos;

l) El archivo de registros;

m) El control del cumplimiento de las BPF

n) La inspección, la investigación y el muestreo, con el fin de controlar factores que puedan afectar la calidad del producto.

Capacitación

2.7. El elaborador debe proporcionar la capacitación de todo el personal cuyas responsabilidades se desarrollan en áreas de producción o en laboratorios de control (incluyendo personal técnico, de mantenimiento y de limpieza), y la de cualquier otro personal cuyas actividades puedan afectar a la calidad del producto.

2.8. Además de la capacitación básica en la teoría y práctica de las Buenas Prácticas de Fabricación, el personal recientemente contratado debe recibir la adecuada capacitación según la responsabilidad que se le haya asignado. Asimismo, se le debe brindar capacitación continua y se debe evaluar su efectividad práctica periódicamente. Se debe disponer de programas de capacitación aprobados por el jefe de Producción o el jefe de Control de Calidad según corresponda. La capacitación debe registrarse y conservarse.

2.9. El personal que trabaja en áreas con riesgo de contaminación, por ejemplo, áreas limpias o áreas donde se manipulan materiales muy activos, tóxicos, infecciosos o sensibilizantes deben recibir capacitación específica.

2.10. Se debe restringir el acceso de los visitantes o del personal no formado a las zonas de producción y control de calidad. Si esta fuera inevitable, se les debe dar información previa, especialmente sobre la higiene personal y la ropa protectora establecida. Dichos visitantes deben ser objeto de estrecha supervisión.

2.11. En la capacitación debe explicarse en profundidad el concepto de Aseguramiento/Garantía de la Calidad y todas las medidas conducentes a mejorar su comprensión e implementación.

Higiene del personal

2.12. Deben establecerse programas de higiene detallados y se los debe adaptar a las diferentes necesidades dentro de la fábrica. Dichos programas deben incluir procedimientos relacionados con la salud, prácticas higiénicas y de vestimenta del personal. El personal que desempeña sus responsabilidades en áreas de producción y control debe comprender y seguir estos procedimientos estrictamente. La dirección de la empresa debe promover los programas de higiene y exponerlos en profundidad durante la capacitación.

2.13. A todo el personal se lo debe someter a un examen médico al contratarlo. Es responsabilidad del elaborador dar instrucciones que garanticen que toda afección de salud que pueda ser de relevancia para la calidad de los productos llegue a su conocimiento. Después del primer examen médico, deben realizarse otros, cuando sea necesario, en función del trabajo y la salud del personal.

2.14. Deben tomarse las medidas tendientes a asegurar, en tanto sea posible, que ninguna persona afectada por alguna enfermedad infecciosa o que posea lesiones abiertas en la superficie expuesta de su cuerpo, esté relacionada con la elaboración de productos farmacéuticos.

2.15. Toda persona que ingrese a las áreas de producción debe utilizar vestimenta de protección adecuada para las operaciones a desarrollar.

2.16. Debe prohibirse el ingerir alimentos, bebidas, masticar, fumar o el almacenamiento de

alimentos y bebidas, elementos para fumar o medicación personal en las áreas de producción y depósito. Debe prohibirse cualquier práctica antihigiénica dentro de las áreas de producción o cualquier otra área donde el producto pueda verse afectado negativamente.

2.17. Debe evitarse el contacto directo entre las manos del operador y el producto expuesto, como así también, cualquier parte del equipamiento que tenga contacto con los productos.

2.18. Al personal se le debe instruir que utilice las instalaciones para el lavado de manos.

2.19. En los Anexos Complementarios se incluye todo requerimiento específico para la elaboración de grupos especiales de productos, por ejemplo, las preparaciones estériles.

CAPÍTULO 3

LOCALES Y EQUIPAMIENTO

PRINCIPIO - Los locales y el equipamiento deben estar ubicados, diseñados, construidos, adaptados y mantenidos de manera tal que sean aptos para las operaciones a desarrollar. Su distribución y diseño debe apuntar a minimizar los riesgos de errores y permitir el efectivo saneamiento y mantenimiento a fin de evitar la contaminación cruzada, acumulación de polvo o suciedad y cualquier efecto adverso para la calidad de los productos en general.

LOCALES

Consideraciones generales

3.1. Los locales deben estar ubicados en un entorno en el que, al considerarlo conjuntamente con las medidas de protección de la producción, presenten el mínimo riesgo de causar la contaminación de materiales o productos.

3.2. Los locales deberán ser cuidadosamente mantenidos, asegurando que las operaciones de reparación y mantenimiento no presenten ningún riesgo para la calidad de los productos. Se los debe limpiar y, cuando corresponda, se los debe sanitizar de acuerdo con un detallado procedimiento escrito.

3.3. La iluminación, la temperatura, la humedad y la ventilación deben ser las apropiadas a fin de que no afecten de manera adversa, directa o indirectamente ni los productos farmacéuticos durante su elaboración y almacenamiento, ni a la exactitud del funcionamiento del equipo.

3.4. Las instalaciones deberán estar diseñadas y equipadas para asegurar la mayor protección contra la entrada de insectos u otros animales.

3.5. Se deben tomar medidas con el objeto de evitar el ingreso de personal no autorizado. Las áreas de producción, almacenamiento y control no deben utilizarse como lugar de paso por el personal que no trabaje en las mismas.

Áreas de Producción

3.6. Con el fin de minimizar el riesgo de graves peligros médicos debido a contaminación cruzada, debe disponerse de instalaciones dedicadas e independientes para la elaboración de medicamentos especiales como materiales altamente sensibilizantes (por ej. penicilinas) o preparaciones biológicas (por ej. procedentes de microorganismos viables). La elaboración de otros productos como ciertos antibióticos, hormonas, citotóxicos, medicamentos muy activos y productos no farmacéuticos no debe realizarse en las mismas instalaciones. Para estos productos de casos excepcionales, se puede aceptar el principio de trabajo en campaña (separación en el tiempo) en las mismas instalaciones, siempre y cuando se adopten precauciones específicas, se realicen las validaciones necesarias, y se disponga de la autorización respectiva por parte de la Autoridad Sanitaria. No se permite la elaboración de productos tóxicos como pesticidas y herbicidas en las instalaciones utilizadas para la elaboración de medicamentos.

3.7. Preferentemente, las instalaciones deberán estar diseñadas de manera tal que permitan que la producción se realice en áreas conectadas en un orden lógico conforme la secuencia de las operaciones y los niveles requeridos de limpieza.

3.8. La adecuación del espacio de trabajo y de almacenamiento en proceso deberán permitir la ubicación ordenada y lógica del equipamiento y los materiales a fin de minimizar el riesgo de confusión entre diferentes medicamentos o sus componentes, evitar la contaminación cruzada y reducir al mínimo el riesgo de omisión o aplicación errónea de cualquiera de las etapas de elaboración o control.

3.9. En los casos en los que la materia prima, el material de acondicionamiento, los productos intermedios o a granel se encuentren expuestos al entorno, las superficies interiores (paredes, pisos y techos) deben ser lisas, sin grietas ni empalmes abiertos, ni se deben desprender de ellas partículas y además, deben permitir su fácil y efectiva limpieza y sanitización, de ser necesario.

3.10. Las tuberías, los montajes de luz, los puntos de ventilación y otros servicios deben estar diseñados y ubicados de tal manera que eviten la creación de huecos difíciles de limpiar. En la

medida de lo posible, a los fines del mantenimiento, debe accederse a ellos desde fuera de las áreas de producción.

3.11. Los desagües deben ser del tamaño adecuado y diseñados para prevenir el reflujo. En lo posible, se deben evitar los canales abiertos, sin embargo ante esta imposibilidad, deben ser poco profundos a fin de facilitar la limpieza y desinfección.

3.12. Las áreas de Producción deben ventilarse de forma eficaz, con instalaciones de control de aire (incluyendo temperatura y, de ser necesario, humedad y filtración) apropiadas para los productos manipulados, las operaciones realizadas en ellas y para el medio ambiente exterior.

3.13. La pesada de los materiales de partida debe realizarse en una sala de pesadas separada y diseñada para este uso.

3.14. En los casos en los que se genera polvo (por ej. durante el muestreo, dispensación, mezclado, elaboración y envasado de productos secos) se deben tomar precauciones específicas a los efectos de evitar la contaminación cruzada y facilitar la limpieza.

3.15. Los locales para el acondicionamiento de medicamentos deben ser diseñados específicamente y dispuestos de manera tal que se eviten las mezclas, confusiones o la contaminación cruzada.

3.16. Las áreas de producción deben estar bien iluminadas, especialmente donde se llevan a cabo controles visuales en línea.

3.17. Los controles en proceso se pueden realizar dentro del área de producción, siempre que no supongan ningún riesgo para la producción.

Áreas de Almacenamiento

3.18. Las áreas de almacenamiento deben contar con capacidad suficiente para permitir el ordenado almacenamiento de las diferentes categorías de materiales y productos: materiales de partida y acondicionamiento, productos intermedios, a granel y terminados, productos en cuarentena, aprobados, rechazados, devueltos o retirados.

3.19. Las áreas de almacenamiento deben estar diseñadas o adaptadas para asegurar buenas condiciones de almacenamiento. En especial, deben estar limpias y secas y mantenerse dentro de límites aceptables de temperatura. En los casos en los que se requieran condiciones especiales (por ej. temperatura, humedad), éstas se deben proporcionar, verificar y controlar.

3.20. Las áreas de recepción y expedición deben proteger los materiales y los productos de las condiciones climáticas. Se debe diseñar y equipar las áreas de recepción para permitir la limpieza de los envases que ingresen, de ser necesario, antes de su almacenamiento.

3.21. Donde se asegure el estado de cuarentena mediante el almacenamiento en áreas separadas, estas áreas deben estar claramente delimitadas y su acceso debe quedar restringido al personal autorizado. Cualquier sistema que reemplace la cuarentena física debe proporcionar una seguridad equivalente.

3.22. Debe existir un área de muestreo separada o con precauciones suficientes para la toma de muestras de las materias primas de tal manera que se evite la contaminación cruzada.

3.23. Debe disponerse de áreas segregadas para el almacenamiento de materiales o productos rechazados, retirados o devueltos.

3.24. Los materiales o productos muy activos deben almacenarse en áreas seguras.

3.25. Los materiales de acondicionamiento impresos se consideran críticos para la conformidad de los medicamentos y se debe prestar especial atención al almacenamiento de estos materiales en áreas segregadas.

Áreas de Control de Calidad

3.26. Los laboratorios de Control de Calidad deben estar separados de las áreas de producción. Esto es particularmente importante en el caso de laboratorios de control de materiales biológicos, microbiológicos y radioisótopos, que a su vez, deben estar separados entre sí.

3.27. Los laboratorios de control deben estar diseñados de forma adecuada a las operaciones que deban realizarse en los mismos. Deben tener suficiente espacio a fin de evitar las mezclas y la contaminación cruzada. Se debe disponer de espacio de almacenamiento apropiado para las muestras y los archivos de los registros.

3.28. Pueden ser necesarias salas separadas para proteger los instrumentos sensibles del efecto de las vibraciones, interferencias eléctricas, humedad, entre otros.

3.29. Se debe cumplir con requisitos especiales en los laboratorios que manipulen sustancias especiales, como muestras biológicas o radioactivas. Es necesario establecer requisitos especiales en los

laboratorios que manipulen sustancias especiales, como muestras biológicas o radiactivas.

Áreas auxiliares

3.30. Las salas de descanso y refrigerio deben estar separadas de las otras áreas.

3.31. Las instalaciones de vestuarios, lavabos y servicios sanitarios deben ser de fácil acceso y adecuados al número de usuarios. Los servicios sanitarios no deben estar en comunicación directa con las zonas de producción o almacenamiento.

3.32. Los talleres de mantenimiento deben ubicarse lo más lejos posible de las áreas de producción. En los casos en los que se almacenen repuestos y herramientas en el área de producción, éstos deben mantenerse en salas o cajones o armarios reservados para tal fin.

3.33. Los bioterios deben encontrarse aislados de las otras áreas, con ingreso separado (acceso de animales) e instalaciones de manejo de aire independientes.

EQUIPAMIENTO

3.34. El equipamiento de producción debe estar diseñado, ubicado y mantenido para cumplir con su uso pretendido.

3.35. Las operaciones de reparación y mantenimiento no deben presentar ningún riesgo para la calidad de los productos.

3.36. El equipamiento de producción debe estar diseñado de forma que posibilite una limpieza fácil y exhaustiva. Debe limpiarse de acuerdo con procedimientos escritos detallados y almacenarse en estado limpio y seco.

3.37. El equipo de lavado y limpieza debe seleccionarse y utilizarse de forma que no constituyan una fuente de contaminación.

3.38. El equipamiento debe instalarse de forma que se evite todo riesgo de error o contaminación.

3.39. El equipamiento de producción no debe presentar ningún riesgo para los productos. Las partes del equipo de producción que tienen contacto con el producto no deben ser reactivos, aditivos o absortivos de forma que afecten la calidad del producto y, en consecuencia, representen algún riesgo.

3.40. Para las operaciones de producción y control debe disponerse de balanzas y equipos de medición de la escala y precisión adecuadas.

3.41. Se deben calibrar y revisar los aparatos de medición, pesaje, registro y control a intervalos definidos, mediante métodos apropiados. Se debe mantener un adecuado registro de estas verificaciones.

3.42. Las tuberías fijas deben encontrarse claramente rotuladas para indicar los contenidos y la dirección del flujo.

3.43. Las tuberías de agua destilada, deionizada y de otro tipo, deben sanitizarse según procedimientos escritos que especifiquen los límites de acción para la contaminación microbiológica y las medidas que deben tomarse.

3.44. De ser posible, debe retirarse el equipamiento defectuoso o fuera de uso de las áreas de producción y control o al menos, debe quedar rotulado claramente como tal.

CAPÍTULO 4

DOCUMENTACIÓN

PRINCIPIO - Un buen sistema de documentación constituye una parte esencial del sistema de Aseguramiento de la Calidad. La documentación escrita claramente evita los errores de la comunicación oral y permite seguir del historial del lote. Las especificaciones, las fórmulas, métodos e instrucciones de fabricación, los procedimientos y los registros deben estar exentos de error y disponibles en forma escrita. La legibilidad de los documentos es de vital importancia.

Consideraciones generales

4.1. Las *Especificaciones* describen en detalle los requisitos que deben cumplir los productos o materiales utilizados u obtenidos durante la elaboración. Sirven de base para la evaluación de la calidad.

Las *Fórmulas Maestras de Elaboración*, las *Instrucciones de Fabricación y Acondicionamiento* establecen todos los materiales de partida utilizados y detallan todas las operaciones de procesamiento y acondicionamiento.

Los *Procedimientos* indican la forma de realizar ciertas operaciones como las de limpieza, vestimenta, control del medio ambiente, muestreo, ensayos y equipamiento.

Los *Registros* suministran el historial de cada lote de producto, incluyendo su distribución como así también, toda circunstancia relevante que sea pertinente a la calidad del producto final.

4.2. Los documentos deben ser cuidadosamente diseñados, preparados, revisados y distribuidos. Deben cumplir con las partes relevantes de los

registros de elaboración y autorización de comercialización.

4.3. Los documentos deben ser aprobados, firmados y fechados por personal calificado y autorizado.

4.4. Los documentos deben estar redactados de forma que se evite toda ambigüedad. Su título, naturaleza y objetivo deben figurar claramente. Su diseño debe ser ordenado y de fácil revisión. La reproducción de documentos de trabajo a partir de documentos maestros no debe permitir la introducción de ningún error en el proceso de reproducción.

4.5. Regularmente, se deben revisar los documentos y se los debe mantener actualizados. Cuando se haya revisado un documento, se debe implementar un sistema para prevenir el uso inadvertido de documentos sin vigencia.

4.6. Los documentos no deben ser manuscritos; sin embargo, cuando los documentos requieran la introducción de datos, estas entradas pueden escribirse a mano con letra clara, legible e indeleble. Debe dejarse suficiente espacio para consignar tales datos.

4.7. Cualquier alteración efectuada sobre un documento debe ser firmada y fechada. La modificación no debe impedir la lectura del dato original. En su caso, habrá que indicar la causa de la modificación. La razón de dicha modificación debe registrarse, cuando fuera necesario.

4.8. Los registros deben llevarse o completarse en el momento en que se lleva a cabo cada actividad y de forma que todas las actividades significativas relacionadas con la elaboración de medicamentos puedan ser rastreadas. Deben conservarse por al menos un año después de la fecha de vencimiento del producto terminado.

4.9. Los datos pueden quedar registrados mediante sistemas electrónicos de tratamiento de datos, o medios fotográficos o de otros confiables, sin embargo debe disponerse de procedimientos detallados relacionados con el sistema en uso y se debe verificar la exactitud de los registros. Si se maneja la documentación mediante métodos de procesamiento de datos electrónicos, solamente personal autorizado debe poder ingresar o modificar los datos en la terminal informática y debe existir un control de cambios y eliminaciones; el acceso debe estar restringido mediante contraseñas u otro medio y se debe verificar independientemente el resultado del ingreso de datos críticos. Los registros de los lotes almacenados electrónicamente deben protegerse mediante copias de seguridad en una cinta magnética, microfilm, papel u otro medio. Es especialmente importante que se pueda acceder fácilmente a los datos durante el período en que se conserven.

Documentos necesarios

ESPECIFICACIONES

4.10. Se debe disponer de especificaciones autorizadas y fechadas adecuadamente para los materiales de partida y acondicionamiento y para los productos terminados; cuando corresponda, también deben existir para productos intermedios o a granel

ESPECIFICACIONES DE LOS MATERIALES DE PARTIDA Y DE ACONDICIONAMIENTO

4.11. Las especificaciones de los materiales de partida y acondicionamiento impreso o primario deben incluir, cuando corresponda:

a) Una descripción de los materiales, incluyendo:
  - *I)* el nombre designado y código interno de referencia,
  - *II)* referencia, de corresponder, a una monografía de farmacopea,
  - *III)* proveedores aprobados y, de ser posible, el elaborador original de los productos,
  - *IV)* una muestra de los materiales impresos.

b) Indicaciones para el muestreo y ensayos o referencia a los procedimientos;

c) Requisitos cualitativos y cuantitativos con límites de aceptación;

d) Condiciones de almacenamiento y precauciones;

e) Período máximo de almacenamiento antes del reanálisis.

ESPECIFICACIONES DE PRODUCTOS INTERMEDIOS Y A GRANE**L**

4.12. Debe disponerse de especificaciones de productos intermedios y a granel, si los mismos se adquieren o se despachan o si los datos obtenidos de los productos intermedios se utilizan para la evaluación del producto terminado. Las especificaciones deben ser similares a las especificaciones de los materiales de partida o de los productos terminados, según corresponda.

ESPECIFICACIONES DE LOS PRODUCTOS TERMINADOS

4.13. Las especificaciones de los productos terminados deben incluir:

a) El nombre del producto y el código de referencia, cuando corresponda;
b) La fórmula o su referencia;
c) Una descripción de la forma farmacéutica y detalles del acondicionamiento;
d) Instrucciones de muestreo y ensayo o una referencia a estos procedimientos;
e) Requisitos cualitativos y cuantitativos con límites de aceptación;
f) Condiciones de almacenamiento y cualquier precaución especial de manipuleo, cuando corresponda;
g) La vida útil.

FÓRMULA MAESTRA DE ELABORACIÓN E INSTRUCCIONES DE FABRICACIÓN

Cada producto y lote a producirse debe poseer una Fórmula Maestra de Elaboración e Instrucciones de Fabricación autorizadas por la Autoridad Sanitaria. Frecuentemente, se las combina en un mismo documento.

4.14. La Fórmula Maestra de Elaboración debe incluir:

a) El nombre del producto, con un código de referencia relacionado con su especificación;
b) Una descripción de la forma farmacéutica, potencia del producto y tamaño del lote;
c) Una lista de todos los materiales de partida que deben utilizarse, con las cantidades respectivas, descritos empleando el nombre designado y una referencia que sea exclusiva de cada material; se debe mencionar cualquier sustancia que pueda desaparecer durante la elaboración;
d) Una declaración del rendimiento final esperado con los límites de aceptación y, de rendimientos intermedios significativos, de corresponder.

4.15. Las Instrucciones de Fabricación deben incluir:

a) Una declaración del local de la elaboración y del equipamiento principal a utilizarse;
b) Los métodos, o referencia a los métodos, a ser utilizados para preparar el equipamiento crítico (por ej. limpieza, ensamblaje, calibración, esterilización);
c) Instrucciones detalladas del proceso paso a paso (por ejemplo, verificaciones del material, tratamientos previos, secuencia de adición de materiales, tiempos de mezclado, temperaturas);
d) Las instrucciones de cualquier control durante el proceso con sus límites;
e) En caso necesario, los requisitos del almacenamiento de productos a granel, incluyendo el envase, el rotulado y condiciones de almacenamiento especiales cuando corresponda;
f) Cualquier precaución especial que deba tenerse en cuenta.

INSTRUCCIONES DE ACONDICIONAMIENTO

4.16. Debe haber Instrucciones de Acondicionamiento autorizadas por la Autoridad Sanitaria para cada producto, tamaño y tipo de envase. Generalmente, deben incluir, o tener una referencia a lo siguiente:

a) Nombre del producto;
b) Descripción de su forma farmacéutica y, potencia cuando corresponda;
c) Tamaño del envase expresado en términos de número de unidades, peso o volumen del producto en su envase final;
d) Una lista completa de todos los materiales de acondicionamiento necesarios para un tamaño de lote estándar, incluyendo cantidades, tamaños y tipos, con el código o número de referencia relacionado con las especificaciones de cada material de acondicionamiento;
e) Cuando corresponda, un ejemplo o reproducción del material de acondicionamiento impreso relevante, y muestras que indiquen donde se deben marcar el número de lote y la vida útil del producto;
f) Precauciones especiales que deben tenerse en cuenta, incluyendo un examen detallado del área y del equipamiento para garantizar que la línea esté libre antes de que comiencen las operaciones;
g) Una descripción de la operación de acondicionamiento, incluyendo cualquier operación auxiliar significativa, y del equipamiento que debe utilizarse;
h) Detalles de los controles durante el proceso con instrucciones para el muestreo y los límites de aceptación.

REGISTRO DE LOTE

4.17. Debe conservarse un Registro de Lote para cada lote elaborado. Debe basarse en las partes

relevantes de la Fórmula Maestra de Elaboración e Instrucciones de Fabricación. El método de preparación de cada registro debe diseñarse a fin de evitar errores de trascripción. El registro debe llevar el número de lote elaborado.

Antes de iniciar la elaboración, debe comprobarse y registrarse que el equipamiento y el lugar de trabajo estén libres de productos, documentos o materiales anteriores no necesarios para el proceso que se va a realizar y que el equipamiento se encuentre limpio y en situación adecuada para su uso.

Durante el proceso, se debe registrar la siguiente información al momento de realizarse cada acción, y al finalizar, el registro debe ser firmado y fechado por la persona responsable de las operaciones de elaboración:

a) El nombre del producto;
b) Las fechas y las horas de inicio, de etapas intermedias significativas y de la finalización de la producción;
c) Nombre de la persona responsable de cada etapa de producción;
d) Iniciales de los operarios de las diferentes etapas significativas de la producción y cuando corresponda, de la persona que verifica cada una de estas operaciones (por ej. pesada);
e) El número de lote y/o número de control analítico, como así también las cantidades de cada material de partida pesadas en realidad (incluyendo el número de lote y la cantidad adicionada de cualquier material recuperado o reprocesado);
f) Cualquier operación o acontecimiento relevante del proceso y equipo principal utilizado;
g) Un registro de los controles durante el proceso y las iniciales de la persona o personas que los realicen, y los resultados obtenidos;
h) La cantidad de producto obtenida en las diferentes etapas de la elaboración (rendimiento);
i) Notas sobre problemas especiales incluyendo detalles, con la autorización escrita de cualquier desvío respecto de la Fórmula Maestra de Elaboración e Instrucciones de Fabricación.

REGISTRO DE ACONDICIONAMIENTO DE LOTE

4.18. Cada lote o parte de lote procesado debe contar con un registro de acondicionamiento de lote. Debe basarse en las partes importantes de las Instrucciones de Acondicionamiento y el método de preparación de esos registros debe ser tal que no permita ningún error de trascripción. El registro debe llevar el número de lote y la cantidad del producto a granel que debe acondicionarse, como así también, el número de lote y la cantidad prevista de producto terminado que se vaya a obtener.

Antes de comenzar las operaciones de acondicionamiento, debe verificarse y registrarse que el equipamiento y el lugar de trabajo se encuentran libres de productos, documentos o materiales anteriores no necesarios para las operaciones de acondicionamiento previstas y que el equipamiento se encuentra limpio y en situación adecuada para su uso.

La siguiente información debe registrarse en el momento que se realiza cada acción y el registro, después de ser completado, debe firmarse y fecharse por el responsable o los responsables de las operaciones de acondicionamiento:

a) El nombre del producto;
b) La(s) fecha(s) y horas de las operaciones de acondicionamiento;
c) El nombre de la persona responsable que haya llevado a cabo la operación de acondicionamiento;
d) Las iniciales de los operarios de los diferentes pasos significativos;
e) Los registros de las verificaciones de la identidad y conformidad con las Instrucciones de Acondicionamiento incluyendo los resultados de los controles en proceso;
f) Los detalles de las operaciones de acondicionamiento realizadas, incluyendo las referencias al equipamiento y las líneas de acondicionamiento utilizadas;
g) Cuando sea posible, muestras de los materiales de acondicionamiento impresos utilizados, incluyendo muestras con el número de lote, fecha de vencimiento y cualquier otra sobreimpresión adicional.
h) Notas sobre cualquier problema especial o evento inusual incluyendo detalles con autorización por escrito de cualquier desvío de las Instrucciones de Acondicionamiento.
i) Las cantidades y números de referencia o identificación de todos los materiales de acondicionamiento y productos a granel entregados, utilizados, destruidos

o devueltos al depósito y las cantidades de producto obtenido, a fin de efectuar una correcta conciliación.

Procedimientos y registros

RECEPCIÓN

4.19. Se debe contar con procedimientos y registros escritos de la recepción de cada entrega de material de partida y de material de acondicionamiento primario e impreso.

4.20. Los registros de las recepciones deben incluir:

a) El nombre de material en el remito de entrega y los envases;
b) Denominación del producto dentro del laboratorio y/o código (si es diferente del punto a);
c) La fecha de recepción;
d) El nombre del proveedor y, de ser posible, el nombre del fabricante;
e) El número de lote o de referencia del fabricante;
f) La cantidad total y el número de envases recibidos;
g) El número de lote asignado después de la recepción;
h) Cualquier comentario de relevancia (por ejemplo sobre el estado de los envases).

4.21. Debe disponerse de procedimientos escritos para el rotulado, cuarentena y almacenamiento de materiales de partida, materiales de acondicionamiento y otros materiales, según corresponda.

MUESTREO

4.22. Debe disponerse de procedimientos escritos de muestreo que incluyan el personal autorizado para tomar muestras, los métodos y el equipamiento que debe utilizarse, las cantidades que deben tomarse y cualquier precaución que deba tenerse en cuenta para evitar la contaminación del material o cualquier deterioro en su calidad (ver Capítulo 6, punto 13).

ANÁLISIS

4.23. Debe disponerse de procedimientos escritos para los ensayos a aplicar en el análisis de los materiales y productos en las diferentes etapas de elaboración, que describan los métodos y equipamientos a utilizarse. Deben registrarse las pruebas realizadas (ver Capítulo 6, punto 17).

OTROS

4.24. Debe disponerse de procedimientos escritos de aprobación/liberación y rechazo de materiales y productos y, en particular, de la liberación para la venta del producto terminado por parte de la(s) persona(s) autorizada(s) designada(s) para tal fin.

4.25. Se deben mantener registros de la distribución de cada lote de un producto a fin de facilitar el retiro del lote del mercado, de ser necesario (ver Capítulo 8).

4.26. Debe disponerse de procedimientos escritos y registros asociados de las actividades realizadas o de las conclusiones alcanzadas, cuando corresponda, para:

a) Validación;
b) Ensamblaje y calibración del equipamiento;
c) Mantenimiento, limpieza y sanitización;
d) Cuestiones relacionadas con el personal incluyendo la capacitación, la vestimenta, la higiene;
e) Control de las condiciones ambientales;
f) Control de plagas;
g) Reclamos;
h) Retiros del mercado;
i) Devoluciones.

4.27. Debe disponerse de instrucciones claras de funcionamiento del equipo principal de fabricación y de control.

4.28. Los equipos más importantes o críticos, deben tener un libro para el registro, según corresponda, de validaciones, calibraciones y operaciones de mantenimiento, de limpieza o reparación, incluyendo las fechas y la identidad de las personas que desarrollaron estas operaciones.

4.29. Los libros de registro también deben asentar, en orden cronológico, el uso de equipamiento importante o crítico y las áreas donde los productos se hayan procesado.

CAPÍTULO 5

PRODUCCIÓN

PRINCIPIO - Las operaciones de producción deben seguir procedimientos claramente definidos; deben cumplir con los principios de las Buenas Prácticas de Fabricación a los efectos de obtener productos de la calidad requerida y ser concordantes con las habilitaciones de elaboración y autorizaciones de comercialización.

Consideraciones generales

5.1. La producción debe ser realizada y supervisada por personal competente.

5.2. Toda manipulación de materiales y productos, como la recepción y cuarentena, el muestreo, almacenamiento, rotulado, dispensación, procesamiento, acondicionamiento y distribución debe realizarse de acuerdo con procedimientos o instrucciones escritos y debe registrarse cuando sea necesario.

5.3. Todo el material entrante debe ser controlado a los efectos de asegurar que la entrega corresponda al pedido. Los envases se deben limpiar cuando sea necesario y rotular con los datos establecidos.

5.4. Los daños en los envases o cualquier problema que pueda afectar adversamente la calidad de un material debe ser investigado, registrado e informado al Departamento de Control de Calidad.

5.5. Los materiales de partida y los productos terminados deben permanecer en cuarentena física o administrativa inmediatamente después de su recepción o elaboración, hasta que se hayan liberado para su uso o distribución.

5.6. Los productos intermedios o a granel que se hayan adquirido como tales, deben ser tratados en la recepción como si fueran materiales de partida.

5.7. Todos los materiales y productos deben almacenarse en las condiciones adecuadas establecidas por el elaborador y de manera ordenada a fin de permitir la separación de lotes y la rotación de las existencias.

5.8. Deben realizarse comprobaciones de rendimiento y balance de cantidades en la medida necesaria para garantizar que no existen discrepancias que excedan los límites aceptables.

5.9. No deben realizarse de forma simultánea o consecutiva en la misma sala, operaciones con productos diferentes, a menos que no exista riesgo de confusión o contaminación cruzada.

5.10. En todas las etapas de la elaboración deben protegerse los productos y materiales de la contaminación microbiana y de otro tipo.

5.11. Durante el trabajo con materiales y productos secos, se deben tomar precauciones para evitar la generación y diseminación de polvo. Esto aplica especialmente a la manipulación de materiales muy activos o sensibilizantes.

5.12. Durante todo el proceso, todos los materiales, envases a granel, equipamiento importante y cuando corresponda las salas utilizadas, se deben rotular, o identificar de otra forma, con una indicación del producto o material que se está procesando, su potencia (de corresponder) y número de lote. Asimismo, en los casos que corresponda, esta indicación debe mencionar la etapa de producción.

5.13. Los rótulos aplicados a los envases, equipamiento o locales deben ser claros, inequívocos y de un formato aprobado por la compañía. Generalmente es útil, además de la escritura en los rótulos, utilizar colores para indicar la situación (por ejemplo, en cuarentena, aceptado, rechazado, limpio, entre otros).

5.14. Se deben efectuar controles a fin de garantizar que las tuberías y otras piezas del equipamiento empleadas para el transporte de productos de un área a otra se encuentren conectados de manera correcta.

5.15. En tanto sea posible, debe evitarse cualquier desvío de las instrucciones o procedimientos. Si ocurriera un desvío, debe ser aprobado por una persona competente, con la participación del Departamento de Control del Calidad, cuando corresponda.

5.16. El acceso a los locales de producción debe limitarse al personal autorizado.

5.17. No se deben utilizar las áreas y el equipamiento destinados a la producción de medicamentos para la producción de productos no farmacéuticos, a menos que se disponga de la autorización explícita por parte de la Autoridad Sanitaria.

Prevención de la contaminación cruzada en la producción

5.18. Se debe evitar la contaminación de una materia prima o de un producto con otro material o producto. El riesgo de contaminación cruzada accidental proviene de la liberación no controlada de polvo, gases, vapores, aerosoles u organismos provenientes de materiales y productos en proceso, de residuos en el equipamiento y de la vestimenta de los operarios. La importancia de este riesgo varía según el tipo de contaminante y producto que se contamine. Entre los contaminantes más peligrosos se encuentran los materiales altamente sensibilizantes, los preparados biológicos que contienen microrganismos viables, ciertas hormonas, citotóxicos y otros materiales muy activos. Los productos en los que la contaminación probablemente sea más significativa son aquellos que se administran por inyección, los que se dan en

grandes dosis y/o durante un período de tiempo prolongado.

5.19. La contaminación cruzada debe evitarse mediante medidas técnicas o de organización adecuadas, por ejemplo:

a) Producción en áreas separadas (necesaria para productos como penicilinas, vacunas o preparaciones de microorganismos viables y algunos otros productos biológicos), o en campaña (separación en tiempo) seguida de una limpieza adecuada;
b) Existencia de esclusas y sistemas de extracción de aire adecuados;
c) Minimizando el riesgo de contaminación causada por la recirculación o reingreso de aire no tratado o tratado insuficientemente;
d) Usando la vestimenta de protección dentro de las áreas donde se procesan productos con especial riesgo de contaminación cruzada;
e) Utilizando procedimientos de limpieza y descontaminación de conocida efectividad, ya que la limpieza deficiente del equipamiento constituye una fuente común de contaminación cruzada;
f) Empleando "sistemas cerrados" de producción;
g) Realizando pruebas para detectar residuos y utilizando rótulos que indiquen el estado de limpieza del equipamiento.

5.20. Se deben revisar periódicamente las medidas adoptadas para evitar la contaminación cruzada y su efectividad de acuerdo con procedimientos establecidos.

Validación

5.21. Los estudios de validación deben reforzar las Buenas Prácticas de Fabricación y se deben realizar de acuerdo con procedimientos definidos. Deben registrarse sus resultados y conclusiones.

5.22. Cuando se adopte una nueva fórmula o método de elaboración, se deben tomar medidas para demostrar su aptitud para la elaboración de rutina. Se debe mostrar que el proceso definido, empleando los materiales y el equipamiento especificados, origina un producto de la calidad requerida de manera consistente.

5.23. Se deben validar las modificaciones significativas en el proceso de producción, incluyendo cualquier cambio en el equipamiento y los materiales que puedan afectar la calidad del producto y/o la reproducibilidad del proceso.

5.24. Los procesos y procedimientos deben ser objeto de revalidación periódica crítica, para garantizar que siguen siendo capaces de proporcionar los resultados previstos.

Materiales de partida

5.25. La adquisición de materiales de partida constituye una operación importante en la que debe participar el personal que tenga conocimiento particular y profundo de los proveedores.

5.26. Las materiales de partida sólo deben adquirirse a proveedores aprobados mencionados en la especificación correspondiente y, cuando sea posible, directamente del productor. Se recomienda que se converse con el proveedor sobre las especificaciones establecidas por el elaborador para el material de partida. Es beneficioso que todos los aspectos de la producción y control, del material de partida en cuestión, incluyendo manipuleo, rotulado y envasado, como así también, los procedimientos de reclamo y rechazo, sean discutidos con el fabricante y el proveedor de los mismos.

5.27. En cada entrega, se deben comprobar la integridad de los envases y sus cierres, como así también la correspondencia entre el remito de entrega y los rótulos del proveedor.

5.28. Si una entrega de material está compuesta por lotes diferentes, cada lote se debe considerar por separado a efectos de muestreo, análisis y aprobación.

5.29. Los materiales de partida en el área de almacenamiento deben estar correctamente rotuladas (ver Capítulo 5, punto 13). Los rótulos deben contener al menos la siguiente información:

a) El nombre designado del producto y el código de referencia interno, cuando corresponda;
b) Un número de lote asignado en la recepción;
c) Cuando corresponda, la condición de los contenidos (por ej. en cuarentena, en análisis, aprobado, rechazado);
d) Si correspondiere, la fecha de vencimiento o fecha a partir de la cual es necesario un reanálisis;

Cuando se utilizan sistemas de almacenamiento totalmente informatizados, no es necesario que toda la información antes mencionada figure de manera legible en el rótulo.

5.30. Debe disponerse de procedimientos o medidas adecuadas para asegurar la identidad del contenido de cada envase de material de partida. Deben identificarse los envases a granel de los que se hayan tomado muestras (Ver Capítulo 6, punto 13).

5.31. Sólo se deben utilizar los materiales de partida aprobados por el Departamento de Control de Calidad y que se encuentre dentro de su vida útil.

5.32. Los materiales de partida sólo deben ser dispensados por personal designado a tal fin, y siguiendo un procedimiento escrito para garantizar que los materiales correctos sean exactamente pesados o medidos dentro de envases limpios y correctamente rotulados.

5.33. Cada material dispensado y su peso o volumen debe ser verificado de forma independiente y dicha verificación debe ser registrada.

5.34. Los materiales dispensados para cada lote deben mantenerse juntos y rotulados como tales de forma visible.

Operaciones de fabricación – Productos intermedios y a granel

5.35. Antes de iniciar cualquier operación de elaboración, se deben tomar medidas tendientes a garantizar que el área de trabajo y el equipamiento se encuentren limpios y libres de cualquier material de partida, producto, residuo de producto o documentos no necesarios para la operación a realizar.

5.36. Los productos intermedios y a granel se deben mantener en las condiciones adecuadas.

5.37. Los procesos críticos deben validarse (ver *Validación* en este capítulo).

5.38. Se deben realizar y registrar los controles en proceso y ambientales que sean necesarios.

5.39. Se debe registrar e investigar cualquier desvío significativo del rendimiento esperado.

Materiales de acondicionamiento

5.40. A la adquisición, manipuleo y control de los materiales de acondicionamiento primarios e impresos se les debe prestar una atención similar a la prestada a los materiales de partida.

5.41. Se debe prestar particular atención a los materiales impresos. Se los debe almacenar en adecuadas condiciones de seguridad para evitar el acceso a ellos de personal no autorizado. Los rótulos cortados y otros materiales impresos sueltos deben almacenarse y transportarse en contenedores cerrados separados a fin de evitar mezclas o confusiones. El material de acondicionamiento debe expedirse para su uso sólo después de haber sido aprobado por personal autorizado siguiendo un procedimiento aprobado y documentado.

5.42. A cada entrega o lote de material de acondicionamiento primario o impreso, se le debe asignar un número específico de referencia o marca de identificación.

5.43. El material de acondicionamiento primario o impreso que haya quedado vencido u obsoleto debe destruirse y su eliminación debe quedar registrada.

Operaciones de acondicionamiento

5.44. Cuando se establece un programa de operaciones de acondicionamiento, debe prestarse especial atención para minimizar el riesgo de contaminación cruzada, mezclas, confusiones o sustituciones. No se deben acondicionar productos diferentes en estrecha proximidad, a menos que exista una separación física.

5.45. Antes de iniciar las operaciones de acondicionamiento, debe verificarse que el área de trabajo, las líneas de acondicionamiento, las máquinas impresoras y el resto del equipamiento se encuentren limpios y libres de otros productos, materiales o documentos previamente utilizados, si estos no son necesarios para la operación en curso. El despeje de la línea debe efectuarse de acuerdo a una lista de verificación adecuada.

5.46. En cada estación o línea de acondicionamiento debe visualizarse el nombre y el número de lote del producto que se está manipulando.

5.47. Todos los productos y materiales de acondicionamiento que se van a utilizar, deben verificarse en el momento de su entrega al departamento de acondicionamiento, para comprobar la cantidad, identidad y conformidad con las Instrucciones de Acondicionamiento.

5.48. Los envases para el llenado deben encontrarse limpios antes de esta operación. Se debe procurar evitar la presencia de cualquier contaminante como fragmentos de vidrio y partículas de metal, y removerlos en caso de estar presentes.

5.49. Por lo general, el llenado y el sellado deben ser inmediatamente seguidos por el rotulado. De no ser así, se deben aplicar los procedimientos adecuados para asegurar que no ocurran mezclas o confusiones, ni errores de rotulación.

5.50. Debe verificarse y registrarse la correcta realización de cualquier operación de impresión (por ejemplo, números de código, fechas de vencimiento) realizada por separado o durante el proceso de acondicionamiento. Se debe prestar atención a la impresión en forma manual, la cual debe revisarse a intervalos regulares.

5.51. Se debe tener especial cuidado al utilizar rótulos cortados y cuando se realice una sobreimpresión fuera de la línea. Por lo general, son preferibles los rollos de rótulos a los rótulos cortados, a fin de ayudar a evitar mezclas o confusiones.

5.52. Se debe verificar el correcto funcionamiento de los lectores de códigos electrónicos, los contadores de rótulos o dispositivos similares.

5.53. La información impresa y grabada en relieve en los materiales de acondicionamiento debe ser clara, estar bien marcada y ser resistente a la decoloración o borrado.

5.54. El control en línea del producto durante el acondicionamiento debe incluir al menos la verificación de lo siguiente:

a) Aspecto general de los envases;
b) Si los envases están completos;
c) Si se utilizan los productos y materiales de acondicionamiento correctos;
d) Si cualquier sobreimpresión es correcta;
e) El correcto funcionamiento de los controles de las líneas.

Las muestras tomadas de la línea de acondicionamiento no deben volver a la misma.

5.55. Los productos que han intervenido en algún hecho inusual solamente pueden reintroducirse en el proceso después de someterse a inspección, investigación y aprobación del personal autorizado de modo especial. Se debe registrar en detalle esta operación.

5.56. Cualquier discrepancia significativa o inusual observada durante la conciliación de la cantidad del producto a granel y materiales de acondicionamiento impresos con el número de unidades producidas, debe ser investigada y explicada satisfactoriamente antes de la liberación.

5.57. Después de terminar una operación de acondicionamiento, se debe destruir cualquier material de acondicionamiento que haya quedado con el número de lote y dicha destrucción debe ser registrada. Se debe seguir un procedimiento documentado si se devuelve al inventario materiales impresos sin codificación.

Productos terminados

5.58. Los productos terminados deben permanecer en cuarentena hasta su liberación final en las condiciones establecidas por el elaborador.

5.59. En el Capítulo 6 (Control de Calidad) se describe la evaluación de los productos terminados y la documentación necesaria antes de liberar el producto para la venta.

5.60. Después de su liberación, los productos terminados deben almacenarse como existencias utilizables, bajo las condiciones establecidas por el elaborador.

Materiales rechazados, recuperados y devueltos

5.61. Los materiales y productos rechazados deben identificarse claramente como tales y almacenarse por separado en áreas de acceso restringido. Deben devolverse a los proveedores o, cuando corresponda, reprocesarse o destruirse. Cualquier medida adoptada, debe ser aprobada y registrada por personal autorizado.

5.62. El reprocesamiento de productos rechazados debe ser excepcional. Sólo se permite si no se afecta la calidad del producto final, si se cumple con las especificaciones y si se realiza de acuerdo a un procedimiento definido y autorizado, luego de la evaluación de los riesgos implicados. Se debe conservar un registro del reprocesamiento.

5.63. La incorporación parcial de lotes anteriores, que cumplen con la calidad requerida, a un lote del mismo producto en una etapa determinada de elaboración, debe autorizarse de antemano. Dicha recuperación debe llevarse a cabo de acuerdo con un procedimiento definido luego de la evaluación de los riesgos implicados, incluyendo cualquier efecto posible en la vida útil. Se debe conservar un registro de la recuperación.

5.64. El Departamento de Control de Calidad debe considerar cualquier necesidad de ensayos adicionales en cualquier producto terminado que haya sido reprocesado o en el que se haya incorporado un producto recuperado.

5.65. Los productos devueltos del mercado, que hayan salido del control del elaborador deben destruirse a menos que, sin lugar a dudas, su calidad sea satisfactoria, sólo después de haber sido críticamente evaluados por el Departamento de Control de Calidad, y autorizado por Aseguramiento de la Calidad, en cumplimiento de un procedimiento

escrito. Esta evaluación debe tener en cuenta la clase de producto, cualquier condición de almacenamiento especial que el mismo requiera, su condición e historial y el tiempo transcurrido desde su distribución. En caso de duda sobre la calidad del producto, no se lo debe considerar apto para una nueva distribución o reutilización.

CAPÍTULO 6

CONTROL DE CALIDAD

PRINCIPIO - El Control de Calidad está referido al muestreo, a las especificaciones y ensayos, como también, a la organización, documentación y procedimientos de aprobación que garantizan la realización de los ensayos pertinentes y necesarios y que los materiales no se aprueban para su uso, ni los productos se liberan para la venta o el suministro, hasta que su calidad haya sido considerada satisfactoria.

El Control de Calidad no se limita a las operaciones de laboratorio, sino que debe intervenir en todas las decisiones que pueden afectar la calidad del producto. La independencia del Control de Calidad respecto a la Producción se considera fundamental para el funcionamiento satisfactorio del mismo. (ver también *Capítulo 1*).

Consideraciones generales

6.1. Cada titular de una habilitación de elaboración debe contar con un Departamento de Control de Calidad. Este departamento debe ser independiente los demás y estar a cargo de una persona con las calificaciones y experiencia adecuadas y con uno o más laboratorios de control a su disposición. Debe disponer con los recursos necesarios para garantizar que todas las decisiones de control de calidad se realizan en la práctica de forma confiable.

6.2. Las principales responsabilidades del jefe de Control de Calidad se resumen en el Capítulo 2. El Departamento de Control de Calidad tendrá otras obligaciones como establecer, validar e implementar todos los procedimientos de control de calidad, mantener las muestras de retención de materiales y productos, garantizar el etiquetado correcto de envases de materiales y productos, realizar el monitoreo de la estabilidad de los productos, participar en la investigación de reclamos relacionados con la calidad de los productos entre otras Todas estas operaciones deben realizarse de acuerdo con procedimientos escritos y se deben registrar.

6.3. La evaluación del producto terminado debe comprender todos los factores significativos, incluyendo condiciones de producción, resultados de los controles durante el proceso, revisión de la documentación de fabricación (acondicionamiento incluido), conformidad con la especificación del control de calidad del producto terminado.

6.4. El personal de Control de Calidad debe tener acceso a las áreas de producción para el muestreo e investigación, entre otros según corresponda,

Buenas prácticas de laboratorio de control de calidad

6.5. Los locales y el equipamiento del laboratorio de control deben cumplir con los requisitos generales y específicos para las áreas de Control de Calidad establecidos en el Capítulo 3.

6.6. El personal, los locales y el equipamiento de los laboratorios deben ser adecuados para la naturaleza y escala de las operaciones de fabricación. La contratación de laboratorios externos, de conformidad con los principios detallados en el Capítulo 7 Análisis por Contrato, puede aceptarse por razones particulares, pero esto debe indicarse en los registros del Control de Calidad.

Documentación

6.7. La documentación de laboratorio debe cumplir con los principios enunciados en el Capítulo 4. Una parte importante de dicha documentación se relaciona con el Control de Calidad y el Departamento de Control de Calidad debe tener a su disposición los siguientes documentos:

a) Especificaciones;
b) Procedimientos de muestreo;
c) Procedimientos de control y registros (incluyendo cuadernos de laboratorio y/o documentos de trabajo utilizados en los análisis);
d) Informes y/o certificados analíticos;
e) Datos del control ambiental, según corresponda;
f) Registros de validación de los métodos analíticos;
g) Procedimientos para la calibración de instrumentos y mantenimiento de equipos y registros de los datos obtenidos.

6.8. Se debe conservar cualquier documentación de Control de Calidad relacionada con el registro de

un lote hasta un año después de la fecha de vencimiento del lote.

6.9. Para algunos tipos de datos (por ej. resultados de pruebas analíticas, rendimientos, controles ambientales), se recomienda que se lleven registros de tal manera que permitan la evaluación de tendencia.

6.10. Además de la información incluida en el registro del lote, se deben conservar otros datos originales como cuadernos y/o registros de laboratorio de forma que estén fácilmente disponibles.

Muestreo

6.11. La toma de muestras debe realizarse en cumplimiento de procedimientos escritos y aprobados que describan:

a) El método de muestreo;
b) El equipamiento que debe utilizarse;
c) La cantidad de muestra que debe tomarse;
d) Las instrucciones para cualquier subdivisión requerida de la muestra;
e) El tipo y la condición del envase que debe utilizarse para la muestra;
f) La identificación de los envases muestreados;
g) Cualquier precaución especial a observarse, especialmente en relación al muestreo de materiales estériles o nocivos;
h) Las condiciones de almacenamiento;
i) Las instrucciones para la limpieza y almacenamiento del equipamiento de muestreo.

6.12. Las muestras deben ser representativas del lote de materiales o productos de los que se las toma. Se pueden tomar otras muestras para controlar la parte más delicada de un proceso (por ej. el inicio o el final de un proceso).

6.13. Los envases de las muestras deben llevar un rótulo que indique el contenido, el número de lote, la fecha del muestreo y los envases de los que se han tomado las muestras.

6.14. Se deben conservar las muestras de retención de cada lote de producto terminado hasta un año después de su fecha de vencimiento. Como regla general, los productos terminados deben conservarse en su envase final y almacenarse bajo las condiciones recomendadas. Las muestras de materiales de partida (excluyendo solventes, gases y agua) deben conservarse por al menos un año después de la fecha de vencimiento del ultimo lote del ultimo producto elaborado con ellas, si su estabilidad lo permite. Dicho período puede acortarse si su estabilidad, de acuerdo con los datos de las especificaciones, es menor. Las muestras de retención de materiales y productos deben conservarse en cantidad suficiente para permitir al menos tres análisis completos.

Análisis

6.15. Los métodos analíticos deben estar validados. Todas las operaciones de control descriptas en la Autorización de Comercialización deben realizarse de acuerdo con los métodos aprobados.

6.16. Los resultados obtenidos deben se registrar y constatar para asegurar que son coherentes entre sí. Todos los cálculos se deben examinar detalladamente.

6.17. Los ensayos realizados deben registrarse y los registros deben consignar al menos la siguiente información:

a) Nombre del material o producto y, cuando corresponda, forma farmacéutica;
b) Número de lote y, de corresponder, elaborador y/o proveedor;
c) Referencia a las especificaciones y los procedimientos de los análisis correspondientes;
d) Los resultados de los ensayos, incluyendo observaciones y cálculos, y referencia a cualquier certificado de análisis;
e) Fechas de los análisis;
f) Iniciales de las personas que realizaron los ensayos;
g) Iniciales de las personas que verificaron los ensayos y los cálculos;
h) Una declaración inequívoca de la aprobación/liberación o rechazo (u otra decisión sobre la condición) y fecha y firma de la persona responsable designada.

6.18. Todos los controles en proceso, incluso los efectuados en el área de producción por parte de personal de producción, deben realizarse de acuerdo con métodos aprobados por el Control de Calidad y se deben registrar sus resultados.

6.19. Se debe prestar especial atención a la calidad de los reactivos de laboratorio, soluciones y material de vidrio para volumetría, estándares de

referencia y medios de cultivo. Deben preparase de acuerdo con procedimientos escritos.

6.20. Los reactivos de laboratorio previstos para un uso prolongado se deben rotular con la fecha de preparación y la firma de la persona que los preparó. La fecha de vencimiento de los reactivos inestables y medios de cultivo debe indicarse en el rótulo junto con las condiciones específicas de almacenamiento. Además, para soluciones volumétricas, se debe indicar la última fecha de estandarización y el último factor vigente.

6.21. Debe indicarse en el envase la fecha de recepción de cualquier sustancia utilizada en los ensayos (por ej. reactivos y estándares de referencia). Se deben seguir las instrucciones de uso y almacenamiento. En algunos casos puede ser necesario realizar un ensayo de identificación y/o de otro tipo en los reactivos al momento de su recepción o antes de su uso, por ejemplo medios de cultivo.

6.22. Los animales utilizados para la evaluación de materiales o productos deben permanecer en cuarentena antes de su utilización, cuando corresponda. Se los debe mantener y controlar de tal manera que se asegure su aptitud para el uso pretendido. Se los debe identificar y se deben llevar adecuados registros sobre el historial de su uso.

Programa de seguimiento de estabilidad de productos en el mercado

6.23. Una vez comercializado un medicamento, se debe controlar la estabilidad, de acuerdo con un programa continuo y adecuado que permita la detección de cualquier problema de estabilidad (por ej. cambios en los niveles de impurezas o perfil de disolución) asociado con la formulación en el envase comercializado.

6.24. El objetivo del programa de seguimiento de estabilidad es monitorear el producto durante su vida útil y determinar que el producto permanece, y puede esperarse que permanezca, dentro de las especificaciones, en las condiciones de almacenamiento indicadas en el rótulo.

6.25. Esto se aplica principalmente a los productos en el envase para la venta, pero se debe también considerar la inclusión en el programa del producto a granel. Por ejemplo, cuando el producto a granel se almacena durante un largo periodo, antes de ser acondicionado y/o enviado de una planta de fabricación a otra planta para su acondicionamiento, se debe evaluar y estudiar el impacto en la estabilidad del producto final y bajo las condiciones ambientales a las que está sometido. Asimismo, se deben tener en cuenta los productos intermedios que son almacenados y utilizados durante largos períodos de tiempo. Los estudios de estabilidad sobre productos reconstituidos se realizan durante el desarrollo del producto y no requieren seguimiento de estabilidad de rutina. Sin embargo, la estabilidad del producto reconstituido puede también controlarse, de ser necesario.

6.26. El programa de seguimiento de estabilidad debe estar descripto en un protocolo escrito, siguiendo las reglas generales del Capítulo 4 y se deben formalizar los resultados como informe. El equipamiento utilizado en el programa de seguimiento de estabilidad (cámaras de estabilidad, entre otros) deben ser calificados y mantenidos siguiendo las normas generales del Capítulo 3 y el Anexo 15 de la presente normativa.

6.27. El protocolo de un programa de seguimiento de estabilidad debe extenderse hasta el final del período de vida útil y debe incluir, pero no limitarse, a los siguientes parámetros:

a) Número de lote(s) por dosis y por tamaños de lotes diferentes, si corresponde;

b) Ensayos físicos, químicos, microbiológicos y biológicos relevantes;

c) Criterios de aceptación;

d) Referencia a los métodos de análisis;

e) Descripción del/los sistema(s) de cierre de los envases;

f) Frecuencia de los ensayos (períodos de tiempo);

g) Descripción de las condiciones de almacenamiento (se deben utilizar condiciones ICH estandarizadas para ensayos a largo plazo, compatibles con el rotulado del producto);

h) Otros parámetros específicos aplicables al medicamento.

6.28. El protocolo del programa de seguimiento de estabilidad en curso puede diferir de aquel estudio de estabilidad a largo plazo inicial presentado en el expediente de la autorización de comercialización, sólo si se justifica y documenta en el protocolo (por ejemplo la frecuencia de ensayos o cuando se lo actualice según las recomendaciones de la ICH).

6.29. El número de lotes y la frecuencia de los ensayos deben suministrar suficientes datos a los efectos de permitir el análisis de tendencia. A no ser que se lo justifique de otra manera, deben incluirse en el programa de estabilidad al menos un lote por

año de producto elaborado por dosis y por cada tipo de acondicionamiento primario, de corresponder (a menos que no se produzca ninguno en el año). Para los productos en los que el programa de seguimiento de estabilidad requiere ensayos en animales y no se dispone de técnicas apropiadas validadas alternativas, la frecuencia del ensayo puede tener en cuenta un enfoque de riesgo-beneficio. Se puede aplicar el principio de reducción de ensayos (“*bracketing*“ y “*matrixing”*), si se los justifica científicamente en el protocolo.

6.30. En ciertas situaciones, se deben incluir lotes adicionales en el programa de seguimiento de estabilidad. Por ejemplo, se debe realizar un estudio de seguimiento de estabilidad después de cualquier cambio o desvío significativo en el proceso de fabricación o de acondicionamiento. También se debe considerar la inclusión de cualquier operación de reprocesamiento o recuperación.

6.31. El personal responsable y, en particular, la Persona/s Autorizada/s deben tener fácil acceso a los resultados de los estudios de seguimiento de estabilidad de productos en el mercado. Los resultados de los estudios de seguimiento de estabilidad deben estar disponibles en la planta de elaboración, o en las instalaciones del laboratorio importador, en el caso de productos importados, para poder ser revisados por la autoridad competente.

6.32. Se deben investigar los resultados fuera de especificación así como cualquier tendencia atípica significativa. Se debe informar a las autoridades competentes sobre cualquier resultado confirmado fuera de especificación o tendencia negativa significativa. Se debe analizar el posible impacto en los lotes del mercado, de acuerdo con el Capítulo 8 de la presente normativa y en consulta con las autoridades competentes.

6.33. Se debe registrar por escrito y conservar un resumen de todos los datos generados, incluyendo cualquier conclusión provisoria sobre el programa. El resumen debe estar sujeto a una revisión periódica.

CAPÍTULO 7

ELABORACIÓN Y ANÁLISIS POR CONTRATO

PRINCIPIO - Se debe definir correctamente, aprobar y controlar la elaboración y análisis por contrato, a fin de evitar confusiones que puedan resultar en la calidad deficiente de un producto o del trabajo. Debe existir un contrato escrito entre el Contratante y el Contratado que establezca claramente las obligaciones de cada parte. El contrato debe delimitar la forma en que la persona autorizada a liberar cada lote de producto para la venta desempeña su función.
NOTA: este Capítulo no afecta la respectiva responsabilidad del contratante y contratado hacia los consumidores

Consideraciones generales

7.1. Debe existir un contrato formal para la elaboración y/o análisis por contrato y cualquier otro acuerdo técnico relacionado.

7.2. Todos los convenios de elaboración y análisis por contrato, incluyendo cualquier modificación de tipo técnico que se proponga deben coincidir con la Autorización de Comercialización del producto en cuestión.

El contratante

7.3. El Contratante es responsable de evaluar la aptitud del Contratado para realizar de forma conveniente el trabajo necesario y de garantizar por medio del contrato que se siguen las BPF descriptas en la presente normativa.

7.4. El Contratante debe suministrar al Contratado de toda la información necesaria para realizar correctamente las operaciones para las que fue contratado, de acuerdo con la Autorización de Comercialización y cualquier otro requerimiento legal.

El Contratante debe asegurarse que el Contratado tiene pleno conocimiento de los problemas asociados con el producto o con el trabajo que pudiera originar un riesgo en sus locales, equipo, personal, otros materiales y otros productos.

7.5. El Contratante debe asegurarse de que todos los productos y materiales procesados que le entregue el Contratado cumplan con sus especificaciones y que los productos hayan sido aprobados por una persona autorizada del Contratado.

El contratado

7.6. El Contratado debe disponer de locales adecuados, equipamiento, conocimiento y experiencia y personal competente para realizar satisfactoriamente el trabajo solicitado por el Contratante. La fabricación por contrato podrá ser realizada sólo por un por un elaborador habilitado para tal fin.

7.7. El Contratado debe asegurarse que todos los productos o materiales entregados son aptos para el fin previsto.

7.8. El Contratado no debe trasladar a un tercero el trabajo encomendado por contrato

7.9. El Contratado no debe desempeñar ninguna actividad que pueda afectar adversamente la calidad del producto elaborado y/o analizado para el Contratante.

El contrato

7.10. El Contratante y el Contratado deben redactar un contrato que especifique sus respectivas responsabilidades relacionadas con la elaboración y el control del producto. Los aspectos técnicos del contrato deben ser elaborados por personas competentes con conocimiento suficiente de la tecnología farmacéutica, de análisis y Buenas Prácticas de Fabricación. Todos los acuerdos de fabricación y análisis deben realizarse conforme a la autorización de comercialización y recibir la aprobación de ambas partes.

7.11. El contrato debe especificar la forma en que el responsable técnico del contratante se asegura que cada lote se ha elaborado y revisado en cumplimiento con los requisitos de la Autorización de Comercialización con el fin de liberar el producto al mercado.

7.12. El Contratante debe definir claramente en el contrato quién realiza cada etapa de elaboración, quién es responsable de la adquisición, control y aprobación de materiales, quién realiza los controles en proceso y quién tiene la responsabilidad del muestreo y análisis de productos intermedios. El contrato debe describir el manejo de materias primas, intermedios, productos a granel y productos terminados, si son rechazados, como así también el procedimiento a seguir si el análisis demuestra que el producto debe ser rechazado.

En el caso del análisis por contrato, el contrato debe especificar el tipo de ensayo a realizar. Solo se admiten aquellos justificados por la normativa específica vigente y el laboratorio de control contratado estará sujeto al mismo régimen de inspección que el titular del producto.

7.13. El Contratante debe disponer de registros de lote, de análisis y distribución, como así también, muestras de retención. Cualquier registro relevante para evaluar la calidad de un producto en el caso de reclamos por algún defecto o su sospecha, debe permanecer accesible y especificado en los procedimientos de retiro de productos del mercado del Contratante.

7.14. El contrato debe permitir el acceso del contratante a las instalaciones del contratado.

7.15. En todos los casos, el Contratado debe aceptar que puede ser inspeccionado por la Autoridad Sanitaria Competente.

CAPÍTULO 8

RECLAMO Y RETIRO DE PRODUCTOS

PRINCIPIO - Todos los reclamos y cualquier otra información relacionada con productos potencialmente defectuosos deben revisarse detalladamente siguiendo procedimientos escritos. Con el fin de prevenir cualquier contingencia, debe diseñarse un sistema para el rápido y efectivo retiro del mercado de productos defectuosos, o sospechosos de serlo si fuera necesario.

Reclamo

8.1. Se debe designar un responsable para gestionar los reclamos y determinar las medidas que deban adoptarse junto con personal idóneo que lo asista. Si el responsable es diferente de la persona calificada esta última debe tomar conocimiento de cualquier reclamo, investigación o retiro.

8.2. Debe disponerse de procedimientos escritos que describan la acción a tomar, incluyendo la necesidad de un retiro, en el caso de existir un reclamo relacionado con un posible defecto de producto.

8.3. Cualquier reclamo referente a un producto defectuoso debe registrarse con todos los pormenores originales y someterse a investigación a fondo. El responsable del Departamento del Control de Calidad debe participar en el análisis de tales problemas.

8.4. Si en un lote de un producto se descubre o sospecha el defecto, se debe considerar la verificación de otros lotes a fin de determinar si también están afectados. En especial, se deben investigar otros lotes que puedan contener partes reelaboradas del lote defectuoso.

8.5. Todas las decisiones y medidas adoptadas como consecuencia de un reclamo deben registrarse y relacionarse con los registros de los lotes correspondientes.

8.6. Regularmente, deben revisarse los registros de los reclamos a fin de obtener una indicación de problemas específicos o recurrentes que requieran atención y, el eventual, retiro de los productos comercializados.

8.7. Se debe prestar especial atención a determinar si un reclamo se debió a una falsificación.

8.8. Las Autoridades Competentes debe tomar conocimiento de si un elaborador considera tomar acciones en respuesta a una posible elaboración defectuosa, deterioro de producto, detección de falsificación o cualquier otro problema serio de calidad con un producto.

Retiro de producto

8.9. Se debe designar un responsable de la ejecución y coordinación de retiros y debe ser asistida por personal idóneo para el manejo de todos los aspectos de los retiros con el correspondiente grado de urgencia. Por lo general, el responsable designado debe ser independiente de los sectores de ventas y comercialización. Si esta persona es diferente del responsable técnico, este último debe tomar conocimiento de cualquier operación de retiro.

8.10. A los efectos de organizar cualquier operación de retiro, deben establecerse procedimientos escritos, verificados periódicamente y actualizados de ser necesario. Dichos procedimientos deben cumplimentar las normativas complementarias.

8.11. Todas las operaciones de retiro deben poder iniciarse con rapidez y en cualquier momento.

8.12. Todas las Autoridades Competentes de todos los países a los que se hayan distribuido los productos deben ser informados de inmediato, si existe la intención de retirar algún producto debido a una sospecha o certeza de defecto.

8.13. El responsable de los retiros debe tener fácil acceso a los registros de distribución, que deben disponer de la suficiente información sobre los mayoristas y clientes de distribución directa (con detalle de domicilios, números de teléfono y/o fax en y fuera del horario laboral, lotes y cantidades entregadas), siendo este punto de aplicación también a los productos exportados y muestras médicas

8.14. Los productos retirados deben ser identificados y almacenados un área segregada mientras se aguarda la decisión sobre su destino final.

8.15. Debe registrarse el progreso del proceso de retiro y se debe emitir un informe final incluyendo la conciliación entre las cantidades de producto entregadas y recuperadas.

8.16. Debe evaluarse regularmente la efectividad de las gestiones de los retiros.

CAPÍTULO 9

AUTOINSPECCIÓN

PRINCIPIO - Deben realizarse autoinspecciones para comprobar el grado de aplicación y cumplimiento de las normas de Buenas Prácticas de Fabricación y proponer las medidas correctivas necesarias.

9.1. Se deben evaluar periódicamente los aspectos del personal, los locales, el equipamiento, la documentación, la producción, el control de calidad, la distribución de los medicamentos, el manejo de los reclamos y los retiros, como así también, la autoinspección; siguiendo un programa preestablecido, para verificar su conformidad con los principios de Aseguramiento de la Calidad.

9.2. Las autoinspecciones deben ser realizadas de forma independiente y pormenorizada por una persona o personas competentes nombradas a tal efecto por la empresa. También pueden ser útiles las inspecciones independientes realizadas por expertos ajenos a la empresa.

9.3. Se deben registrar todas las autoinspecciones. Los informes deben incluir todas las observaciones realizadas durante las inspecciones y, de corresponder, las medidas correctivas propuestas. Asimismo, deben registrarse todas las acciones tomadas como consecuencia de la autoinspección.

PARTE II

BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE INGREDIENTES

FARMACÉUTICOS ACTIVOS

1 INTRODUCCIÓN

Objetivo

Esta normativa define los lineamientos generales para la aplicación de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) de ingredientes farmacéuticos activos (IFAs), bajo un sistema apropiado de manejo de la calidad. Se intenta asegurar que los IFAs satisfagan los requerimientos de calidad y pureza que deben poseer.

Fabricación, incluye todas las operaciones de recepción de materiales, producción, envasado, re-envasado, rotulado, re-rotulado, control de calidad, liberación, almacenamiento y distribución de IFAs y los controles relacionados en cada etapa.

La presente normativa, no cubre aspectos de seguridad para el personal comprometido en la fabricación ni aspectos de protección para el medio ambiente. Estos controles son responsabilidad inherente al elaborador y están regidos por normativas específicas.

1.1 Aplicación Regulatoria

Dentro de la comunidad mundial, los materiales pueden variar en su clasificación legal como IFA. Cuando un material es clasificado como un IFA en la región o país en el cual es elaborado y/o utilizado en un medicamento, debe fabricarse acorde a esta normativa.

1.2 Alcances

Esta normativa se aplica a la fabricación de IFAs para uso en medicina humana (productos medicinales de uso humano) y abarca la fabricación de IFAs estériles sólo hasta la etapa inmediatamente anterior a su transformación en un producto estéril; si bien los procesos de esterilización y procesamiento aséptico no están cubiertos en la guía, los mismos deben ser realizados de acuerdo con los principios de BPF que fija la legislación para la fabricación de productos estériles. Se excluye la sangre total y el plasma dado que la guía para establecimientos que manipulan sangre fija requerimientos detallados sobre recolección y controles aplicados a la sangre. Sin embargo incluye IFAs que son producidos usando sangre y plasma como materia prima. Finalmente, no aplica a productos medicinales a granel pero sí a todos los otros materiales de partida activos estando sujetos a los requerimientos BPF allí descriptos, en particular los Anexos II a VII donde se definen las exigencias suplementarias para determinados IFAS.

Este anexo abarca IFAs elaborados por síntesis química, extracción, fermentación/ cultivo de células, recolección de fuentes naturales o alguna combinación de estos procesos.

Un "Material de Partida IFA" es una materia prima intermediario o IFA que es usado en la producción de otro IFA, y que es incorporado como un fragmento estructural significativo en la estructura del mismo. Puede ser un artículo comercial, un material provisto por uno o más proveedores bajo contrato o acuerdo comercial o producido en la misma planta elaboradora. Un material de partida IFA normalmente tiene definida la estructura y las propiedades químicas.

El fabricante debe señalar y documentar los fundamentos del punto en el cual la producción del IFA comienza. Para procesos de síntesis, esto es conocido como el punto en el cual el "Material de Partida IFA" es introducido en el proceso. Para otros procesos (por ejemplo fermentación, extracción, purificación, etc.) el fundamento deberá establecerse caso por caso.

La *Tabla I* da una guía del punto en el cual el "Material de Partida IFA" es introducido normalmente en el proceso.

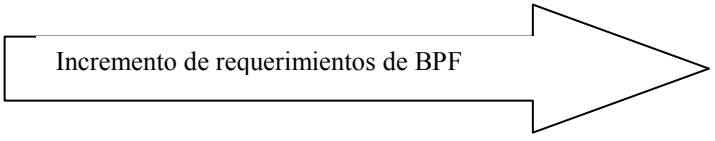
A partir de este punto, deben aplicarse las BPF descriptas en esta normativa para todas las etapas del proceso de fabricación. Esto incluye la validación de las etapas críticas del proceso determinando el impacto en la calidad del IFA. Sin embargo, debe hacerse notar que el hecho de que una empresa elija validar una etapa del proceso, no necesariamente define a esa etapa como crítica.

Los requerimientos de BPF deben aplicarse en las etapas en gris con letra itálica en la *Tabla I*. Esto no implica que todas las etapas descriptas en la tabla deban completarse. La rigurosidad de BPF en la elaboración de IFAs debe incrementarse a medida que el proceso avanza desde las primeras etapas a las finales, como purificación y envasado embalaje. Los procesos físicos de IFAs tales como granulación, recubrimiento o manipulación física de tamaño de partícula (por ejemplo micronizado, molienda) deben manejarse al menos con los estándares de esta guía.

Esta normativa de BPF no se aplica a etapas previas a la introducción del definido "Material de Partida IFA".

TABLA I: Aplicación de esta guía a la fabricación / elaboración de IFAs

Tipo de fabricación elaboración	Etapas de aplicación (señaladas en gris) de esta guía				
Elaboración química	Producción del material de partida del IFA	*Introducción del material de partida del IFA en el proceso*	*Producción de intermediario (s)*	*Aislación y purificación*	*Procesamiento físico y envasado*
IFA de origen animal	Recolección de órganos, fluidos y tejidos	Corte, mezcla y/o procesamiento inicial	*Introducción del material de partida del IFA en el proceso*	*Aislación y purificación*	*Procesamiento físico y envasado*
IFA de origen vegetal	Recolección de la planta	Corte y extracción inicial	*Introducción del material de partida del IFA en el proceso*	*Aislación y purificación*	*Procesamiento físico y envasado*
Extractos herbarios	Recolección de la planta	Corte y extracción inicial		*Extracción posterior*	*Procesamiento físico y envasado*
IFAs provenientes de hierbas molidas o en polvo	Recolección de plantas y/o cultivo y cosecha	Corte y molienda			*Procesamiento físico y envasado*
Biotecnología Fermentación/ cultivo de células	Establecimiento de banco maestro de células y de un banco de trabajo de células	*Mantenimiento del banco de trabajo de células*	*Cultivo de células y/o fermentación*	*Aislación y purificación*	*Procesamiento físico y envasado*
Fermentación "Clásica" para producir un IFA	Establecimiento de un banco de células	Mantenimiento del banco de células	*Introducción de las células en la fermentación*	*Aislación y purificación*	*Procesamiento físico y envasado*



2. GERENCIA DE CALIDAD

Principio

2.1 - La calidad debe ser responsabilidad de todas las personas involucradas en la fabricación.

2.2 - Cada elaborador debe establecer, documentar e implementar un sistema efectivo para procurar calidad que involucre la participación activa de la alta gerencia y el personal de fabricaciónapropiado.

2.3 - El sistema de manejo de la calidad debe abarcar la estructura de organización, procedimientos, procesos y recursos, así como actividades necesarias para asegurar confidencialidad, para que los IFAs satisfagan las especificaciones propuestas de calidad y pureza. Todas las actividades relacionadas con la calidad deben estar definidas y documentadas.

2.4 - Debe existir una/s unidad/es de calidad independiente de producción y que satisfaga las responsabilidades de aseguramiento de la calidad (AC) así como las responsabilidades de control de calidad (CC). Pueden presentarse como unidades separadas de AC y CC o como una única unidad, dependiendo del tamaño y estructura de la organización.

2.5 - Deben especificarse las personas autorizadas para liberar intermediarios e IFAs.

2.6 - Todas las actividades relacionadas con calidad deben registrarse en el momento en que se realizan.

2.7 - Cualquier desviación de los procedimientos establecidos debe documentarse y explicarse. Las desviaciones críticas deben ser investigadas y la investigación y sus conclusiones deben documentarse.

2.8 - Ningún material debe liberarse o utilizarse antes de haberse completado satisfactoriamente la evaluación por las unidades de calidad, a menos que en el lugar existan sistemas apropiados que permitan su uso (por ejemplo, liberar en cuarentena como se describe en la sección “Procedimientos de distribución”, o el uso de materiales de partida o intermediarios pendientes de evaluación completa).

2.9 - Deben existir procedimientos para notificar oportunamente a la alta gerencia sobre las inspecciones regulatorias, serias deficiencias de BPF, productos con defectos y acciones relacionadas (por ejemplo, quejas relacionadas con calidad, retiros del mercado, acciones regulatorias, etc.).

Responsabilidades de Unidad(es) de Calidad

2.10 - La(s) unidad(es) de calidad debe involucrarse en todos los temas relacionados con la calidad.

2.11 - La(s) unidad(es) de calidad debe revisar y aprobar todos los documentos relacionados con la calidad.

2.12 - Las responsabilidades de mayor importancia de la(s) unidad(es) de calidad no deben delegarse. Estas responsabilidades deben estar descriptas por escrito y deben incluir, pero no necesariamente estar limitadas a:

a) Liberar o rechazar todos los IFAs. Liberación o rechazo de intermediarios para uso fuera de la compañía elaboradora;

b) Establecer un sistema de liberación o rechazo de materiales de partida, intermediarios y materiales de acondicionamiento y rotulado;

c) Revisar en forma completa los registros del lote de producción y de los controles del laboratorio de las etapas críticas del proceso antes de la liberación del IFA para su distribución;

d) Asegurar que las desviaciones críticas sean investigadas y resueltas;

e) 5 Aprobar todas las especificaciones e instrucciones de la Orden Maestra de Producción;

f) Aprobar todos los procedimientos que impactan la calidad de intermediarios o IFAs;

g) Asegurar que se realicen auditorías internas (autoinspecciones);

h) Aprobar intermediarios o I FAs elaborados por contrato;

i) Aprobar cambios que potencialmente impacten en la calidad de intermediarios o IFAs;

j) Revisar y aprobar protocolos de validación e informes;

k) Asegurar que las quejas relacionadas con la calidad sean investigadas y resueltas;

l) Asegurar que existen sistemas efectivos para el mantenimiento y calibración del equipamiento crítico;

m) Asegurar que los materiales son controlados apropiadamente y los resultados son informados;

n) Asegurar que existan estudios de estabilidad que avalen períodos de reanálisis o fechas de vencimiento y condiciones de almacenamiento en IFAs y/o intermediarios, cuando corresponda;

o) Realizar revisiones periódicas de la calidad del producto (como se define en "Revisión de calidad del producto").

Responsabilidades para las Actividades de Producción

2.13 - La responsabilidad de las actividades de producción deben describirse por escrito y deben incluir, pero no necesariamente limitarse a:

a) Preparar, revisar, aprobar y distribuir las instrucciones para la producción de intermediarios o IFAs acorde a procedimientos escritos;

b) Producir IFAs, y cuando corresponda, intermediarios acorde a i nstrucciones preaprobadas;

c) Revisar todos los registros de lote de producción y asegurar que estén completos y firmados;

d) Asegurar que todas las desviaciones de producción son comunicadas, evaluadas, y que las desviaciones críticas son investigadas y las conclusiones registradas;

e) Asegurar que las instalaciones de producción se encuentren limpias y, cuando corresponda, desinfectadas;

f) Asegurar que las calibraciones necesarias hayan sido realizadas y se mantengan los registros;

g) Asegurar que los edificios y el equipamiento se encuentren mantenidos y se lleven los correspondientes registros;

h) Asegurar qu e los protocolos de validación son revisados y aprobados;

i) Evaluar las propuestas de cambio en el producto, proceso o equipamiento;

j) Asegurar, cuando corresponde, que luego de cambios en las instalaciones y el equipamiento, éstos sean calificados.

Auditorias Internas (Autoinspecciones)

2.14 - Para cumplir con los principios de BPF para IFAs, deben realizarse auditorias internas regulares de acuerdo con un programa aprobado.

2.15 - Los resultados de las auditorias y las acciones correctivas deben documentarse y ser consideradas por la alta gerencia. Las acciones correctivas convenidas deben cumplimentarse en tiempo prefijado y de manera efectiva.

Revisión de Calidad del Producto

2.16 - Deben efectuarse revisiones periódicas de calidad de IFAs con el objetivo de verificar la consistencia del proceso. Normalmente, tales revisiones deben ser realizadas y documentadas en forma anual y deben incluir al menos:

a) Una revisión de resultados de controles críticos en proceso y de ensayos críticos de control de calidad para IFAs;

b) Una revisión de todos los lotes que no cumplieron con las especificaciones establecidas;

c) Una revisión de todos los desvíos críticos o de no conformidad e investigaciones relacionadas;

d) Una revisión de todo cambio realizado en el proceso o método analítico;

e) Una revisión de los resultados del monitoreo del programa de estabilidad;

f) Una revisión de todos los rechazos relacionados con la calidad, quejas y del mercado;

g) Una revisión del grado de avance de las acciones correctivas.

2.17 - Los resultados de estas revisiones deben evaluarse y debe establecerse si corresponde realizar una revalidación. Las razones para tales acciones correctivas deben documentarse. Las acciones correctivas convenidas deben cumplimentarse en tiempo prefijado y de manera efectiva

3. PERSONAL

Calificación

3.1 - Debe haber un número adecuado de personal calificado con la apropiada educación, experiencia y/o entrenamiento para llevar a cab o y supervisar la elaboración de intermediarios e IFAs.

3.2 - Las responsabilidades de todo el personal involucrado en la elaboración de intermediarios e IFAs deben estar especificadas por escrito.

3.3 - El entrenamiento debe hacerse regularmente por personas calificadas y debe cubrir

como mínimo las operaciones que cada empleado realiza y las BPF relacionadas con las funciones del empleado. Deben mantenerse registros de entrenamiento y estos deben ser periódicamente evaluados.

Higiene

3.4 - El personal debe cumplir con hábitos de salud e higiene.

3.5 - El personal debe vestir ropa limpia y adecuada para la actividad de elaboración con la cual esta involucrado, y debe cambiarse cuando corresponda. La ropa protectora adicional, para cabeza, cara, manos y brazos debe usarse cuando sea necesario, para proteger intermediarios e I FAs de la contaminación.

3.6 - El personal debe evitar el contacto directo con intermediarios e IFAs.

3.7 - Fumar, comer, beber, mascar, y el almacenamiento de alimentos, debe restringirse a áreas asignadas, separadas de las de elaboración.

3.8 - El personal que sufre enfermedades infecciosas o con lesiones abiertas en superficies expuestas del cuerpo no debe ocuparse en actividades que puedan comprometer la calidad de los IFAs. Cualquier persona que muestre en algún momento (tanto por examen médico o por observación de un supervisor) tener una aparente enfermedad o lesión abierta, debe excluirse de las actividades en las cuales las condiciones de salud puedan afectar adversamente la calidad del IFA, hasta que las condiciones sean corregidas o el personal médico calificado determine que la inclusión de la persona no arriesga la seguridad o calidad del IFA.

Consultores

3.9 - Los consultores asesores de fabricación y control de intermediarios e IFAs deben tener suficiente educación, entrenamiento y experiencia o una combinación de todo ello, para asesorar en la materia para la cual son contratados.

3.10 - Deben llevarse registros indicando nombre, dirección y calificaciones del consultor, y tipo de servicio provisto por éste.

4. EDIFICIOS E INSTALACIONES (SERVICIOS DE SOPORTE)

Diseño y Construcción

4.1 - Los edificios e instalaciones usados en la fabricación de intermediarios e I FAs deben ubicarse, diseñarse y construirse facilitando la limpieza, el mantenimiento y las operaciones apropiadas al tipo y etapa de elaboración. Las instalaciones deben diseñarse para minimizar la potencial contaminación. Si se hubiesen establecido especificaciones microbiológicas para intermediarios o IFAs, las instalaciones deben diseñarse en forma apropiada para limitar la exposición a contaminaciones microbiológicas inconvenientes.

4.2 - Los edificios e instalaciones deben tener espacio adecuado para la ubicación ordenada del equipamiento y así prevenir confusiones y contaminación.

4.3 - Todo equipamiento que posea por si mismo protección adecuada del material (por ejemplo, sistema cerrado) puede ubicarse en el exterior.

4.4 - El flujo de materiales y personal a través del edificio o anexos debe diseñarse para prevenir confusiones o contaminación.

4.5 - Deben definirse áreas u otros sistemas de control para las siguientes actividades:

a) Recepción, identificación, muestreo y cuarentena de materiales entrantes, pendientes de liberación;

b) Cuarentena antes de la liberación de intermediarios e IFAs;

c) Muestreo de intermediarios e IFAs;

d) Permanencia de materiales rechazados antes de la disposición final (por ejemplo, devolución, reprocesado o destrucción);

e) Almacenamiento de materiales liberados;

f) Operaciones de producción;

g) Acondicionamiento y etiquetado;

h) Operaciones de laboratorio.

4.6 - Debe proveerse al personal de los sanitarios adecuados, provistos de agua fría y caliente, así como de jabón o detergente apropiados, secadores de aire o servicio de toallas individuales. Deben estar separados de áreas de elaboración, pero con fácil acceso desde las mismas. Cuando sea necesario debe proveerse de adecuadas áreas de duchas o cambio de ropa.

4.7 - Las áreas de laboratorio deben estar separadas del área de producción. Aquellas usadas

para controles en proceso, pueden ubicarse en áreas de producción, teniendo en cuenta que las operaciones del proceso de producción no afecten adversamente la exactitud de las medidas de laboratorio, y el laboratorio y sus operaciones no afecten los procesos de producción de intermediarios o IFAs.

Servicios

4.8 - Todos los servicios que puedan afectar la calidad del producto (por ejemplo: vapor, gases, aire comprimido y calefacción, ventilación y acondicionamiento de aire) deben estar calificados y monitoreados convenientemente y deberán tomarse acciones cuando los límites sean excedidos. Debe disponerse de esquemas para estos sistemas de servicios.

4.9 - Debe proveerse cuando sea necesario de adecuada ventilación, filtración de aire y sistemas de extracción. Estos sistemas deberán diseñarse y construirse minimizando riesgos de contaminación y contaminación cruzada, y deberán incluir equipos para control de la presión de aire, microorganismos (si corresponde), polvo, humedad y temperatura en forma adecuada durante la etapa de elaboración. Se deberá prestar especial atención a aq uellas áreas donde los IFAs se encuentren expuestos al medio ambiente.

4.10 - En el caso que el aire sea recirculado a áreas de producción, deben tomarse medidas apropiadas p ara el control de riesgo de contaminación cruzada.

4.11 - Todas las cañerías instaladas deben estar adecuadamente identificadas mediante la identificación de las líneas individuales, documentación, sistemas de control informático, u otros medios alternativos. Las cañerías deben ubicarse apropiadamente para evitar el riesgo de contaminación de intermediarios o IFAs.

4.12 - Los drenajes deben ser de tamaño adecuado y deben estar provistos de una toma de aire o u n dispositivo adecuado para evitar reflujo, cuando corresponda.

Agua

4.13 - El agua usada en la elaboración de IFAs debe ser adecuada para dicho uso.

4.14 - El agua de proceso debe como mínimo seguir la guía de OMS para calidad de agua potable, a menos que se justifique otra calidad.

4.15 - Cuando el agua potable es insuficiente para asegurar la calidad del IFA, y son exigidas estrictas especificaciones químicas y/o microbiológicas de calidad de agua, deben establecerse especificaciones apropiadas para parámetros físico/químicos, recuento microbiano total, organismos objetables y/o endotoxinas.

4.16 - Si el agua utilizada en el proceso es tratada por el elaborador para alcanzar una determinada calidad, el proceso de tratamiento debe validarse y monitorearse estableciéndose límites apropiados de acción.

4.17 - Cuando se elabora un IFA no estéril destinado a la producción de un medicamento estéril, el agua utilizada en la aislación final y en las etapas de purificación debe monitorearse y controlarse respecto del recuento microbiano total, organismos objetables y endotoxinas.

Áreas de Contención

4.18 - En la producción de materiales sensibilizantes tales como penicilinas y cefalosporinas, las áreas de producción deben ser dedicadas. Pueden incluir instalaciones, unidades manejadoras de aire y/o equipos de producción.

4.19 - Deberán también utilizarse áreas de producción dedicadas cuando se trate de materiales de naturaleza infecciosa, de alta actividad farmacológica o toxicidad (por ejemplo, ciertos esteroides o agentes citotóxicos anticancerosos) a menos que los procedimientos de limpieza y/o inactivación estén validados y se mantengan.

4.20 - Deben establecerse e implementarse medidas apropiadas para prevenir contaminación cruzada entre personal, materiales, etc., que se trasladen de un área dedicada a otra.

4.21 - Ninguna actividad productiva (incluyendo pesada, molienda o e nvasado) de material no farmacéutico, altamente tóxico tales como herbicidas y pesticidas, deberá realizarse utilizando las instalaciones y/o equipamiento usado para la producción de IFAs. El manejo y almacenamiento de estos materiales deberá estar separado del de los IFAs.

Iluminación

4.22 - En todas las áreas debe proveerse de adecuada iluminación para facilitar la limpieza, el mantenimiento y las distintas operaciones.

Desagües y Residuos

4.23 - Todos los residuos y desechos (por ejemplo, sólidos, líquidos o gases provenientes de

la elaboración) producidos en y desde los edificios y las áreas adyacentes deben eliminarse oportunamente de manera inocua y en forma sanitaria. Los contenedores y los conductos para materiales de desecho deben estar claramente identificados.

Sanitización y Mantenimiento

4.24 - Los edificios utilizados para la elaboración de intermediarios y e IFAs deben estar mantenidos apropiadamente y en condiciones de limpieza adecuadas.

4.25 - Deben establecerse procedimientos escritos asignando responsabilidades para la sanitización y describiendo programas, métodos y equipamiento de limpieza y los materiales utilizados en los edificios e instalaciones.

4.26 - Cuando sea necesario, deben establecerse procedimientos escritos para el uso adecuado de rodenticidas, insecticidas, fungicidas y agentes fumigantes de limpieza y sanitizantes, para prevenir la contaminación del equipamiento, de los materiales de partida, de embalaje, etiquetado, intermediarios e IFAs.

5. EQUIPAMIENTO DE PRODUCCIÓN

Diseño y Construcción

5.1 - El equipamiento usado en la fabricación de intermediarios e I FAs debe ser de apropiado diseño y tamaño adecuado, y estar correctamente ubicado para el uso previsto, su limpieza, sanitización (si corresponde) y mantenimiento.

5.2 - El equipamiento debe estar construido de forma tal que las superficies en contacto con los materiales de partida, intermediarios o IFAs no alteren su calidad, más allá de especificaciones oficiales u otras.

5.3 - El equipamiento de producción debe usarse solo dentro del rango de su calificación de operación.

5.4 - El equipamiento principal (por ejemplo reactores, contenedores de almacenamiento) y líneas de proceso instaladas de manera permanente usados durante la producción del intermediario o IFA, deben estar adecuadamente identificados.

5.5 - Ninguna sustancia asociada con el funcionamiento del equipamiento tales como lubricantes, fluidos de enfriamiento o calefacción, deben estar en contacto con los intermediarios o IFAs ni alterar su calidad, más allá de especificaciones oficiales u otras. Cualquier desviación de esto debería evaluarse para asegurar que no hay detrimento en la aptitud del material. Deben usarse, cuando sea posible, lubricantes y aceites grado alimenticio.

5.6 - Cuando sea necesario, debe usarse equipamiento cerrado o contenido. Si se utiliza un equipo abierto o se procede a la apertura del mismo, deben tomarse adecuadas precauciones para minimizar el riesgo de contaminación.

5.7 - Debe mantenerse un c onjunto de esquemas actualizados de equipamiento e instalaciones críticas (por ejemplo, instrumentación).

Mantenimiento y Limpieza del Equipamiento

5.8 - Deben establecerse programas y procedimientos (incluyendo asignación de responsabilidades) para el mantenimiento preventivo del equipamiento.

5.9 - Deben establecerse procedimientos escritos para la limpieza del equipamiento y su subsecuente liberación de uso para la elaboración de intermediarios e I FAs. Los procedimientos de limpieza deben contener suficientes detalles para permitir que operarios la efectúen en cada equipo de manera efectiva y reproducible. Estos procedimientos deberán incluir:

a) Asignación de responsabilidad para la limpieza del equipamiento;

b) Programas de limpieza incluyendo, cuando sea necesario, programas de sanitización;

c) Descripción completa de métodos y materiales incluyendo dilución de agentes limpiadores utilizados;

d) Cuando corresponda, instrucciones para desarmar y rearmar cada parte del equipo para asegurar una adecuada limpieza;

e) Instrucciones para remover o destruir la identificación del lote anterior;

f) Instrucciones para la protección de la contaminación del equipo limpio, previo a su uso;

g) Inspección del equipo para la limpieza inmediatamente antes del uso;

h) Cuando corresponda, establecer el máximo tiempo que puede transcurrir entre el momento en que se completa el

proceso y la limpieza del equipamiento.

5.10 - Los equipos y utensilios deben limpiarse, guardarse y cuando corresponda sanitizarse o esterilizarse para prevenir contaminación o arrastre de material anterior que podría alterar la calidad del intermediario o IFA, más allá de especificaciones oficiales u otras.

5.11 - Cuando el equipamiento está asignado a producción continua o campaña de sucesivos lotes del mismo intermediario o IFA, el equipamiento debe limpiarse en intervalos apropiados para prevenir formación o arrastre de contaminantes (por ejemplo, niveles de microorganismos objetables).

5.12 - Para prevenir contaminación cruzada, los equipos no dedicados deben limpiarse entre producción de diferentes materiales.

5.13 - Deben definirse y justificarse los criterios de aceptación para residuos, los procedimientos y agentes de limpieza.

5.14 - El equipamiento debe identificarse por medios apropiados respecto de su contenido y estadío de limpieza.

Calibración

5.15 - El equipamiento de control, pesadas, medidas, monitoreo y ensayos críticos para asegurar la calidad de los intermediarios o IFAs, debe ser calibrado acorde a procedimientos escritos y un programa establecido.

5.16 - Las calibraciones deben realizarse utilizando estándares trazables o certificados, si existiera.

5.17 - Deben conservarse registro de estas calibraciones.

5.18 - El estado de calibración actualizado de equipamiento crítico debe ser conocido y verificado.

5.19 - No deben utilizarse instrumentos que no posean criterios de calibración.

5.20 - Las desviaciones de estándares de calibración aprobados en instrumentos críticos, debe investigarse para determinar el impacto en la calidad de los intermediarios o IFAs elaborados utilizando este equipamiento después de la última calibración satisfactoria.

Sistemas Informáticos

5.21 - Los sistemas informáticos relacionados con BPF deben validarse. La profundidad y extensión de la validación depende de la diversidad, complejidad y la criticidad de la aplicación computarizada.

5.22 - La calificación de la instalación y la calificación operacional debe demostrar la adecuación de hardware y software para realizar la tarea asignada.

5.23 - El software comercialmente disponible que ha sido calificado no requiere el mismo nivel de testeo. Si el sistema que existe no fue validado en la instalación, una validación retrospectiva puede llevarse a cabo si está disponible la documentación adecuada.

5.24 - Los sistemas informáticos deben tener suficientes controles para prevenir acceso no autorizado o cambio de datos. Debe haber control para prevenir omisiones en datos (por ejemplo, sistema desconectado y datos no capturados). Debe haber registro de cualquier cambio de datos realizado, el ingreso previo, quien realizó el cambio y cuándo fue realizado.

5.25 - Deben estar disponibles los procedimientos escritos para la operación y mantenimiento de los sistemas informáticos.

5.26 - Cuando se ingresan manualmente datos críticos debe haber un control adicional en la exactitud de la entrada. Dicha operatoria puede ser realizada por un segundo operador o por el mismo sistema.

5.27 - Si se producen incidentes en sistemas informáticos que puedan afectar la calidad de intermediarios o IFAs, la confiabilidad de los registros o resultados de análisis, éstos deben registrarse e investigarse.

5.28 - Los cambios en sistemas informáticos deben realizarse de acuerdo a los cambios de procedimiento y deben ser formalmente autorizados, documentados y testeados. Los registros deben llevarse para todos los cambios, incluyendo modificaciones y mejoras hechas al hardware, software y cualquier otro componente crítico del sistema. Estos registros deben demostrar que el sistema se mantiene en estado de validación.

5.29 - Si se produce una caída del sistema o él mismo falla, lo cual conduce a una pérdida permanente de registros debe proveerse de un sistema “back up”. Para todo sistema informático debe establecerse un medio de protección de aseguramiento de datos.

5.30 - Los datos pueden ser registrados por un segundo medio además del sistema informático.

6. DOCUMENTACIÓN Y REGISTRO

Sistema de Documentación y Especificaciones

6.1 - Todos los documentos relacionados con la elaboración de intermediarios o IFAs deben prepararse, revisarse, aprobarse y distribuirse de acuerdo a procedimientos escritos. Tales documentos pueden estar en papel o en forma electrónica.

6.2 - La emisión, revisión, reemplazo y retiro de todos los documentos debe ser controlada con mantenimiento de revisiones históricas.

6.3- Debe ser establecido un procedimiento para mantener disponibles todos los involucrados en las operaciones (por ejemplo, informes de desarrollos históricos, de scale-up, de transferencia técnica y de procesos de validación; registros de entrenamiento, de producción, de control y de distribución). Los períodos de retención de estos documentos deben especificarse.

6.4 - Todos los registros de control, de producción y distribución deben ser retenidos por lo menos durante un año posterior a la fecha de vencimiento del lote. En el caso de IFAs con fecha de re-análisis los registros deben mantenerse por lo menos durante tres años posteriores a l a distribución completa del lote.

6.5 - Las entradas en los registros deben ser realizadas en forma indeleble en los espacios provistos para tal fin, inmediatamente después de realizada la actividad e i dentificando a l a persona que la realiza. Las correcciones a dichas entradas deben poseer fecha y firma y permitir la lectura del original.

6.6 - Durante el período de retención los registros originales o sus copias deben estar disponibles en el establecimiento donde se desarrollan las actividades descriptas. Los registros pueden trasladarse a otro sitio por medios electrónicos u otros.

6.7 - Las especificaciones, instrucciones, procedimientos y registros pueden retenerse como originales o copias certificadas tales como fotocopias, microfilms, microfichas u otros. Cuando se utilizan técnicas de reducción tales como microfilm o registro electrónico, debe disponerse del equipamiento adecuado para obtener una copia segura.

6.8 - Se deben establecer y documentar especificaciones para materiales d e partida, intermediarios cuando fuera necesario, IFAs, etiquetas y materiales de acondicionamiento. Además deben establecerse especificaciones apropiadas para otros materiales como coadyuvantes de proceso, juntas u otros materiales utilizados durante la producción de intermediarios o IFAs que puedan impactar de forma crítica en la calidad de los mismos. Se deben establecer y documentar criterios de aceptación para controles en proceso.

6.9 - Si se usa firma electrónica en los documentos ésta debe ser autenticada y segura.

Limpieza de Equipamiento y Registros de Uso

6.10 - Los registros de uso, limpieza, sanitización y/o esterilización y mantenimiento de los equipos principales deben llevar fecha y hora (si corresponde), producto, y número de lote de cada lote procesado en el equipo y la persona que ha realizado la limpieza y el mantenimiento del mismo.

6.11 - Si el equipo está dedicado a l a elaboración de un intermediario ó IFA, los registros individuales del equipo no son necesarios si los lotes del intermediario ó IFA siguen una secuencia trazable. En el caso en que se utilicen equipos dedicados, los registros de limpieza, mantenimiento y uso pueden formar parte del registro de lote.

Registros de Materiales de Partida, Intermediarios, Materiales de Envasado y Rotulado de IFAs.

6.12 - Los registros deben mantenerse incluyendo:

a) El nombre del elaborador, identidad y cantidad de cada despacho de cada lote de material de partida, intermediarios, ó materiales de envasado y rotulado para los IFAs; el nombre del proveedor; el número de control del proveedor, si se conoce, u o tro numero de identificación; el numero asignado y la fecha de recepción.

b) Los resultados de cualquier ensayo o análisis realizado y las conclusiones derivadas de los mismos.

c) Registros trazables del uso de materiales.

d) Documentación correspondiente al examen y revisión de los materiales de envasado y rotulado de IFAs, en conformidad con las especificaciones establecidas.

e) La decisión final respecto al rechazo de materiales de partida, materiales de envasado y rotulado de IFAs y sus intermediarios.

f) 6.13 Los rótulos maestros (aprobados) deben mantenerse para ser comparados con los emitidos.

Instrucciones Maestras de Producción (Registros Maestros de Producción y Control)

6.14 - Para asegurar la uniformidad de lote a lote, las instrucciones maestras de producción para cada intermediario e I FA deben ser preparadas, fechadas y firmadas por una persona, e independientemente supervisadas, fechadas y firmadas por personal de la unidad de calidad.

6.15 - Las instrucciones deben incluir:

a) El nombre del intermediario o IFA a ser elaborado y un código de identificación de referencia si corresponde.

b) Una lista completa de materiales de partida, e intermediarios designados por los nombres códigos suficientemente específicos para identificar cualquier característica especial de calidad.

c) Un informe exacto de la cantidad o proporción de cada material de partida o intermediario a ser usado, incluyendo la unidad de medida. Cuando la cantidad no es fija, el cálculo para cada tamaño de lote debe incluirse. Se deben justificar las variaciones en las cantidades, el área de elaboración y el equipamiento utilizado.

d) Las instrucciones detalladas de producción deben incluir:

I) Secuencias a seguir.
II) Especificaciones de proceso.
III) Instrucciones de muestreo y controles en proceso con sus criterios de aceptación cuando corresponda.
IV) Tiempos límites para completar etapas individuales del proceso y/o el proceso total cuando corresponda.
V) Rendimientos esperados en los tiempos y etapas del proceso.
VI) Cuando sea necesario, anotaciones especiales y precauciones a seguir.
VII) Instrucciones para almacenamiento del intermediario o IFA, para asegurar su aptitud de uso, incluyendo materiales de acondicionamiento y rotulado, y condiciones y tiempos límites de almacenamiento.

Registros de lote de Producción y Control

6.16 - Los Registros de Producción deben prepararse para cada intermediario e IFA y deben incluir información completa relacionada a l a producción y control de cada lote. El registro de cada lote de producción debe controlarse antes de su emisión para asegurar que corresponda a la versión correcta y sea una reproducción segura de las instrucciones maestras de producción.

6.17 - Los registros deben enumerarse con un único número de identificación o lote, ser fechados y firmados al ser emitidos. En producción continua, el código de producto junto con la fecha y la hora de fabricación pueden servir como única identificación hasta tanto se asigne el número definitivo.

6.18 - La documentación de cada etapa significativa del proceso en el registro del lote de producción debe incluir:

a) Fecha y tiempos.

b) Identificación de los principales equipos (por ejemplo: reactores secadores, mezcladoras, etc.) utilizados.

c) Identificación específica de cada lote incluyendo pesos, medidas, y número de lotes de materiales de partida, intermediarios o cualquier material reprocesado utilizado durante la elaboración.

d) Resultados reales registrados para parámetros críticos de procesos.

e) Muestreos realizados.

f) Firma de las personas que llevan a cabo y supervisan o evalúan directamente cada etapa crítica en la operación.

g) Resultados de análisis de laboratorio en proceso.

h) Rendimiento real en etapas y tiempos del proceso.

i) Descripción del envase, empaque y rotulado para intermediarios o IFAs.

j) Rótulos representativos del IFA o intermediario.

k) Cualquier desviación detectada, su evaluación, su investigación si

corresponde o una referencia de que la misma se realiza.

l) Resultados del ensayo de liberación.

6.19 - Deben establecerse y seguirse procedimientos escritos para las desviaciones críticas o fallas observadas en lotes de intermediarios o IFAs para cumplir especificaciones. La investigación debe extenderse a otros lotes que puedan estar asociados con fallas o desviaciones específicas.

Registros de Laboratorio de Control

6.20 - Los registros de laboratorio de control deben incluir datos completos obtenidos de los análisis realizados para asegurar el cumplimiento con los estándares y especificaciones establecidas, incluyendo:

a) Una descripción de las muestras recibidas para ensayo, incluyendo el nombre del material u origen, número de lote u otro código distintivo, fecha de muestreo y, cuando corresponda, la cantidad y la fecha de recepción de las mismas.

b) Una referencia de cada método de análisis utilizado.

c) Una referencia sobre pesadas y medidas de muestras utilizadas para cada análisis según el método descripto; datos sobre preparación y análisis de estándares de referencia, reactivos y soluciones estándar.

d) Un registro completo de los datos crudos generados en cada análisis, cromatogramas, espectros y registros debidamente identificados con el número de lote analizado.

e) Hoja de cálculo incluyendo, por ejemplo, unidades de medida, factores de conversión y equivalencias.

f) Informe de los resultados y su comparación con los criterios de aceptación establecidos.

g) Firma del analista y fecha en que se realizaron los análisis.

h) Fecha y firma de un supervisor.

6.21 - Deben mantenerse los informes completos de los registros para poder realizar:

a) Cualquier modificación de un método analítico establecido.

b) Calibración periódica de instrumentos y aparatos.

c) Ensayos de estabilidad realizados en IFAs.

d) Investigaciones sobre datos fuera de especificaciones.

Revisión de Registros de lote de Producción.

6.22 - Deben establecerse y seguirse procedimientos e scritos para la revisión y aprobación de registros de lote de producción y control de laboratorio, incluyendo envasado y rotulado, para determinar el cumplimiento con las especificaciones establecidas del intermediario o IFA antes de liberar el lote o distribuirlo.

6.23 - Los registros de lote de producción y control de laboratorio de etapas críticas del proceso deben ser revisados y aprobados por la unidad de calidad antes que el lote de IFA sea liberado o distribuido. Los correspondientes a etapas no críticas del proceso pueden ser revisados por personal calificado de producción u otras unidades, siguiendo procedimientos aprobados por la unidad de calidad.

6.24 - Toda desviación, i nvestigación e informe fuera de especificaciones, debe ser revisado como parte del registro de lote previo a s u liberación.

6.25 - La unidad de calidad puede delegar a la de producción, la responsabilidad y autoridad para liberar intermediarios, excepto en aquellos casos en que el intermediario se transfiera a un destino en el cual se halla fuera del control del fabricante.

7. MANEJO DE MATERIALES.

Controles Generales.

7.1 - Deben existir procedimientos que describan la recepción, identificación, cuarentena, almacenamiento, manipulación, muestreo, análisis y aprobación o rechazo de materiales.

7.2 - Los elaboradores de intermediarios y/o IFAs deben poseer un sistema para la evaluación de suministros de materiales críticos.

7.3 - Los materiales deben ser adquiridos de acuerdo a es pecificaciones establecidas a proveedores aprobados por la unidad de calidad.

7.4 - Si el proveedor de un material crítico no es el elaborador, el productor del intermediario y/o IFA debe disponer del nombre y la dirección del mismo.

7.5 - Los cambios de proveedor de materiales de partida críticos deben ser tratados de acuerdo a la

sección 13, Control de Cambios.

Recepción y Cuarentena

7.6 - Desde el ingreso y hasta su aprobación, cada contenedor o grupo de contenedores de materiales debe ser examinado visualmente para un correcto rotulado (incluída la correlación entre el nombre usado por el proveedor y el utilizado en la empresa si fuesen diferentes), daños en el contenedor, sellos rotos y evidencias de descomposición o contaminación. Los materiales deben permanecer en cuarentena hasta haber sido muestreados, analizados o examinados si corresponde y liberados para su uso.

7.7 - Antes de que los materiales ingresados sean mezclados con el stock existente (por ejemplo: solventes o stocks en silos) deben cumplir el ensayo de identificación, ser analizados si corresponde, y liberados. Deben estar disponibles procedimientos escritos para prevenir la descarga errónea de materiales en el stock existente.

7.8 - Si los graneles recibidos se almacenan en tanques no dedicados, debe asegurarse que no existe contaminación cruzada a partir de los mismos. Para asegurar que esto no ocurra debe incluirse en forma total o parcial la siguiente documentación:

a) Certificado de limpieza
b) Análisis de trazas de impurezas
c) Auditorias del proveedor

7.9 Se deben identificar los contenedores principales y sus correspondientes conductos, así como las líneas de llenado y descarga.

7.10 Cada contenedor de materiales o grupo de ellos, debe identificarse con un código distintivo, lote o número de recepción. Dicho número debe ser usado en el registro de disposición de cada lote. Debe existir un sistema que permita identificar el estado de cada lote.

Muestreo y Análisis de Materiales de Producción Entrantes

7.11 - Se debe realizar al menos un análisis para verificar la identidad de cada lote de material, con excepción de los materiales descriptos en 7.12. Un certificado de análisis del proveedor puede ser usado en lugar de realizar otros ensayos, con tal que el elaborador posea un sistema para la evaluación de sus proveedores.

7.12 - La aprobación del proveedor debe incluir una evaluación que aporte evidencia adecuada de que el elaborador puede proveer consistentemente materiales que cumplan especificaciones. Se deben realizar análisis completos sobre por lo menos tres lotes antes de reducir los análisis internos. Sin embargo, como mínimo, un análisis completo debe ser llevado a cabo a intervalos apropiados y comparado con el Certificado de Análisis. La confiabilidad de los Certificados de Análisis debe evaluarse a intervalos regulares.

7.13 - Los coadyuvantes de proceso, materiales de partida altamente tóxicos o peligrosos, otros materiales especiales ó materiales transferidos a otra unidad dentro del control de la compañía, no requieren análisis si el Certificado de Análisis del elaborador se obtiene, demostrando que dichos materiales de partida cumplen con las especificaciones establecidas. El examen visual de los contenedores, su rótulo y el registro de su número de lote, debe ayudar en la identificación de dichos materiales. La ausencia de análisis propios para estos materiales, debe justificarse y documentarse.

7.14 - El muestreo del lote de material debe ser representativo. El método de muestreo debe especificar el numero de contenedores a muestrear, qué parte del contenedor es muestreada y la cantidad de material a muestrear en cada contenedor. El número de contenedor a muestrear y el tamaño de la muestra debe basarse en un plan de muestreo que tenga en consideración la criticidad del material, la variedad del material, los datos de calidad históricos del proveedor y la cantidad necesaria para el análisis.

7.15 - El muestreo debe realizarse en un ambiente definido y con procedimientos diseñados para prevenir la contaminación del material muestreado y de otros materiales.

7.16 - Los contenedores a muestrear deben ser abiertos cuidadosamente y posteriormente cerrados. Debe indicarse que el mismo ha sido muestreado.

Almacenamiento

7.17 - Los materiales deben manipularse y almacenarse de manera de prevenir degradación, contaminación y contaminación cruzada.

7.18 - Los materiales almacenados en tambores, cajas, o bolsas, no deben situarse sobre el piso y, cuando corresponde, deben estar adecuadamente separados para permitir su limpieza o inspección.

7.19 - Los materiales deben almacenarse en condiciones y por un período de tiempo que no afecte de manera adversa su calidad, y debe

controlarse que se utilice primero el stock más antiguo.

7.20 - Ciertos materiales pueden almacenarse al aire libre en contenedores adecuados, provistos de rótulos de identificación que permanezcan legibles. Los contenedores deben limpiarse previamente a ser abiertos para su uso.

7.21 - Los materiales rechazados deben identificarse y controlarse bajo un sistema de cuarentena diseñado para prevenir su uso en la elaboración.

Re-evaluación

7.22 - Cuando corresponda, los materiales deben ser re-evaluados para determinar la conveniencia de su uso (por ejemplo, luego de un prolongado almacenamiento o exposición al calor o la humedad).

8. PRODUCCION Y CONTROLES EN PROCESO

Operaciones de Producción

8.1 - Los materiales de partida para la elaboración de intermediarios e IFAs deben pesarse bajo condiciones que no afecten su idoneidad. Los instrumentos de pesada y medida deben tener la exactitud adecuada para el uso propuesto.

8.2 - Si el material es subdividido para su posterior uso en operaciones de producción, los contenedores deben ser adecuados para el uso e identificarse con la siguiente información:

1. Nombre del material y/o código.
2. Número de control o recepción.
3. Peso o medida del material en el nuevo envase.
4. Fecha de re-análisis o de re-evaluación, si corresponde.

8.3 - Las pesadas críticas, medidas u operaciones de subdivisión del material deben ser supervisadas o estar sujetas a un control equivalente. Previo a su uso, personal de producción debe verificar que los materiales son los especificados en el registro de lote para el intermediario o IFA propuesto.

8.4 - Otras actividades críticas deben ser supervisadas o estar sujetas a un control equivalente.

8.5 - Los rendimientos reales deben compararse con los esperados en las distintas etapas de producción. Deben establecerse los rendimientos esperados y sus respectivos rangos basados en pruebas de laboratorio, escalas piloto o datos de fabricación. Las desviaciones en el rendimiento asociadas con etapas críticas del proceso, deben investigarse para determinar su impacto o potencial impacto en la calidad resultante de los lotes correspondientes.

8.6 - Cualquier desviación debe documentarse y explicarse. Cualquier desviación crítica debe investigarse.

8.7 - Debe indicarse el estado de las unidades principales del equipamiento de proceso, ya sea en las unidades individuales del equipamiento o por medio de documentación apropiada, sistema informático u otros medios alternativos.

8.8 - Los materiales a ser reprocesados deben controlarse adecuadamente para prevenir su uso no autorizado.

Tiempos límites

8.9 - Si se establece un tiempo límite en las instrucciones maestras de producción (ver 6.14) el mismo debe asegurar la calidad de los intermediarios e IFAs. Las desviaciones deben ser documentadas y evaluadas. Los tiempos límites pueden ser inapropiados cuando durante el proceso se deba alcanzar un valor previsto para determinado parámetro (por ejemplo: ajuste de pH, hidrogenación, secado hasta alcanzar una especificación predeterminada). En este caso, las etapas del proceso o la finalización de las reacciones deben determinarse por muestreos y controles en proceso.

8.10 - Los intermediarios necesarios para procesos posteriores deben almacenarse bajo condiciones apropiadas que aseguren su aptitud de uso.

Muestreo y Controles en Proceso

8.11 - Se deben establecer procedimientos escritos que permitan monitorear la evolución y el control de las etapas del proceso, las cuales puedan causar variabilidad en la calidad de intermediarios e IFAs. Los controles en proceso y sus criterios de aceptación deben definirse basándose en la información obtenida durante las etapas de desarrollo o por datos históricos.

8.12 - El criterio de aceptación y el tipo y alcance de los controles, dependerán de la naturaleza del intermediario o IFA que se esté elaborando, de la reacción o etapa del proceso que se esté realizando y del grado en que el proceso

pueda producir una variación en la calidad del producto. En las primeras etapas de proceso puede ser apropiado realizar controles en proceso menos exigentes, mientras que deberán realizarse controles más estrictos en las últimas etapas (por ejemplo etapas de aislación, purificación).

8.13 - La unidad(es) de calidad debe redactar y aprobar procedimientos escritos sobre controles críticos en proceso (y monitoreo de procesos críticos), incluyendo puntos de control y métodos utilizados.

8.14 - Los controles en proceso pueden ser realizados por personal calificado del Departamento de Producción. El proceso puede ser ajustado sin aprobación previa por la unidad(es) de calidad, si el ajuste se realiza dentro de los límites aprobados por la unidad(es) de calidad. Todos los controles y resultados deben ser exhaustivamente documentados como parte del registro de lote.

8.15 - Deben existir procedimientos escritos para métodos de muestreo de materiales en proceso, intermediarios e IFAs. Los planes de muestreo y procedimientos deben basarse en prácticas de muestreo científicamente comprobadas.

8.16 - Los muestreos en proceso deben realizarse utilizando procedimientos que eviten la contaminación del material muestreado. Los procedimientos deben establecerse de manera de asegurar la integridad de la muestra después de obtenida.

8.17 - Normalmente no son necesarias investigaciones de resultados fuera de especificación para aquellos análisis en proceso realizados con el propósito de monitorear y/o ajustar el mismo.

Mezcla de Lotes de Intermediarios o IFAs

8.18 - Para el propósito de esta normativa, "mezcla" se define como el proceso de combinar materiales incluídos dentro de la misma especificación para producir un intermediario o IFA homogéneo. La mezcla de fracciones en proceso de un lote en particular (por ejemplo recolección de varias cargas de centrífuga a partir de un único lote de cristalización) para su posterior procesamiento, se considera parte del proceso de producción y no una mezcla.

8.19 - Los lotes fuera de especificación no deben ser mezclados con otros lotes con el propósito de cumplir especificaciones. Cada lote incorporado en la mezcla debe ser elaborado usando el proceso establecido y debe ser analizado individualmente corroborando que cumpla especificaciones antes de ser incorporado a l a mezcla.

8.20 - Las operaciones aceptables en el mezclado incluyen, pero no se limitan a:

a) Mezclado de pequeños lotes para incrementar el tamaño de lote;
b) Mezcla de remanentes (por ejemplo pequeñas cantidades de material aislado) provenientes de lotes del mismo intermediario o IFA para formar un único lote.

8.21 - Los procesos de mezclado deben ser adecuadamente controlados y documentados, y el lote de la mezcla debe ser analizado debiendo cumplir las especificaciones establecidas.

8.22 - El registro de lotes del proceso de mezclado debe permitir la trazabilidad retrospectiva hacia los lotes individuales que dieron origen a la mezcla

8.23 - Cuando los parámetros físicos de los IFAs son críticos (por ejemplo: IFAs usados en formas sólidas orales o s uspensiones), las operaciones de mezclado deben validarse para demostrar homogeneidad del lote obtenido. La validación debe incluir el análisis de parámetros críticos (por ejemplo, distribución de tamaño de partícula, densidad del granel) que pueden ser afectados.

8.24 - Si el proceso de mezclado afecta la estabilidad, deben realizarse controles adecuados al producto obtenido.

8.25 - La fecha de vencimiento o de re-análisis del lote obtenido por mezcla debe basarse en la fecha de elaboración del remanente o del lote más antiguo utilizado en la mezcla.

Control de Contaminación

8.26 - Si existe un control adecuado, los materiales remanentes pueden ser transferidos a sucesivos lotes del mismo intermediario o IFA. Los ejemplos incluyen residuos adheridos a las paredes de un micronizador, capa residual de cristales húmedos posterior a la descarga de centrífuga y una descarga incompleta de fluidos o cristales provenientes de reactores hacia el siguiente paso del proceso. Esta práctica no debe dar lugar a u na transferencia de degradados o de contaminación microbiana que pueda alterar el perfil de impurezas establecido para el IFA.

8.27 - Las operaciones de producción deben realizarse de manera de prevenir la contaminación de intermediarios o IFAs por otros materiales.

8.28 - Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación cuando se manipulan IFAs posteriormente a su purificación.

9. ENVASADO Y ROTULADO IDENTIFICATORIO DE IFAS E INTERMEDIARIOS

Generalidades

9.1 - Deberán escribirse procedimientos que describan la recepción, identificación, cuarentena, muestreo, evaluación, liberación y manipuleo de los materiales de envasado y rotulado.

9.2 - Dichos materiales deberán cumplir con especificaciones establecidas. Los materiales que no las cumplan deberán ser rechazados a fin de evitar su utilización accidental.

9.3 - Deberán llevarse registros del movimiento de dichos materiales sean estos aceptados o rechazados, especificando su recepción y evaluación.

Materiales de Envasado

9.4 - El envase debe proveer protección adecuada del IFA o intermediario contra deterioro o contaminaciones que pudieran darse durante su transporte o almacenamiento.

9.5 - El envase debe ser limpio y, cuando el producto lo requiera, sanitizado en forma adecuada para el uso pretendido. No debe ser reactivo, aditivo o absortivo como para alterar la calidad del producto dentro de los límites especificados.

9.6 - Si el envase es reutilizable, deberá ser limpiado según procedimientos escritos.

Emisión y Control de Rótulos

9.7 - El acceso a las áreas de rotulado estará restringido a personal autorizado.

9.8 - Deben usarse procedimientos para conciliar las cantidades de materiales emitidos, utilizados y devueltos. Toda discrepancia deberá ser investigada, y dicha investigación deberá ser aprobada por el Departamento de Calidad.

9.9 - Todo exceso de materiales ya impresos con un número de lote, deberá ser destruido. Los materiales destinados a devolución deberán almacenarse apropiadamente de forma de evitar confusiones.

9.10 - Los rótulos obsoletos deberán ser destruidos.

9.11 - El instrumental utilizado para la impresión de rótulos debe ser controlado de forma de asegurar que toda impresión realizada cumpla con las especificaciones del Registro de Producción de cada lote.

9.12 - Los rótulos emitidos para un lote deben ser examinados cuidadosamente a fin de verificar la conformidad con las especificaciones del Registro Maestro de Producción. El resultado de dicha examinación deberá ser documentado.

9.13 - El Registro de Producción de cada lote deberá guardar un ejemplar del rótulo correspondiente.

Operaciones de Envasado y Rotulado

9.14 - Deberán existir procedimientos documentados a fin de asegurar el uso de los materiales de envasado y rotulado apropiados.

9.15 - Deberá prevenirse toda confusión durante las operaciones de rotulado, por medio de una adecuada separación espacial entra las operaciones relacionadas con distintos IFAs o intermediarios.

9.16 - Los rótulos usados en los envases de IFAs e intermediarios deben indicar el nombre o código identificatorio del producto, el número de lote, y las condiciones de almacenamiento dado que dicha información es crítica para asegurar la calidad del producto.

9.17 - Si el IFA o intermediario se transferirá a algún destino en el cual no se hallará bajo el control del fabricante, deberá incluirse también en el rótulo los datos correspondientes a: nombre y dirección del fabricante, cantidad de producto contenido, condiciones especiales de transporte, y requerimientos legales especiales. Si el IFA posee una fecha de vencimiento, esta debe indicarse en el rótulo y en el Certificado de Análisis. Si el producto posee una fecha de re-evaluación, esta debe indicarse en el rótulo y/o en el Certificado de Análisis.

9.18 - Las instalaciones para el envasado y el rotulado deben ser inspeccionadas inmediatamente antes de ser usadas, a fin de asegurar que ningún material necesita ser cambiado para la próxima operación. El resultado de dicha inspección deberá asentarse en los registros de producción o control del lote.

9.19 - Los IFAs e intermediarios empacados y

rotulados deben inspeccionarse a fin de verificar que los envases llevan el rótulo correcto. El resultado de dicha inspección deberá asentarse en los registros de producción o control del lote.

9.20 - Los envases de IFAs o intermediarios que se transferirán a algún destino en el cual no se hallarán bajo el control del fabricante, deberán cerrarse herméticamente, de forma que si dicho cierre es violado, el receptor estará alertado acerca de la posibilidad de que el producto se halle alterado.

10. ALMACENAMIENTO Y DISTRIBUCIÓN

Procedimientos de Almacenamiento

10.1 - Las instalaciones deben ser adecuadas para el depósito de todos los materiales en condiciones apropiadas (por ejemplo, temperatura y humedad controladas cuando esto sea necesario). Deben llevarse registros de dichas condiciones cuando estas sean críticas para el mantenimiento de las características del producto.

10.2 - A menos que exista un sistema alternativo para prevenir el uso no autorizado o accidental de los productos correspondientes a cuarentena, rechazo, devolución o recuperación, deberán asignarse áreas separadas de almacenamiento temporario para dichos productos hasta que se tome la decisión sobre el destino que se les dará.

Procedimientos de Distribución

10.3 - Los IFAs e intermediarios sólo podrán ser liberados para su distribución a terceros cuando el Departamento de Calidad los haya liberado. Los IFAs e intermediarios en cuarentena podrán ser transferidos a hacia otros Departamentos bajo el control de la empresa cuando el Departamento de Calidad así lo autorice, y si los controles y documentación están en regla.

10.4 - Los IFAs e intermediarios deben transportarse de forma de no afectar su calidad.

10.5 - Las condiciones especiales de transporte o almacenamiento deben constar en el rótulo de los IFAs e intermediarios que así lo requieran.

10.6 - El elaborador debe asegurar que el contratista de transporte para los IFAs e intermediarios conozca y cumpla las condiciones de almacenamiento y transporte adecuadas.

10.7 - Debe existir un sistema de registros de distribución que permita la recuperación de cada lote de IFAs y/o intermediarios.

11. CONTROLES DE LABORATORIO

Controles Generales

11.1 - Los Departamentos de Calidad independientes deben tener a su disposición instalaciones de laboratorio adecuadas.

11.2 - Deberán existir procedimientos documentados para el muestreo, la evaluación, la aprobación o rechazo, y el registro y archivo de los datos de laboratorio. Los registros del laboratorio deben llevarse de acuerdo con la Sección “Registros de Laboratorio de Control”.

11.3 - Las especificaciones, técnicas de muestreo y procedimientos de evaluación deben ser apropiados y con fundamento científico, a fin de asegurar que las materias primas, los IFAs, los intermediarios y los materiales de rótulo y envasado cumplen con los estándares de calidad y/o pureza. Las especificaciones y procedimientos de evaluación deben ser consistentes con aquellos registrados en los archivos. Podrán existir especificaciones adicionales a las incluidas en los archivos. Las especificaciones, técnicas de muestreo y procedimientos de evaluación, incluidos los cambios en ellos, deben ser propuestos por una unidad organizacional adecuada, y aprobados por el Departamento de Calidad.

11.4 - Las especificaciones para los IFAs deben ser establecidas de acuerdo con estándares aceptados, y consistentes con los procesos de manufactura. Ellas deben incluir un control de impurezas (por ejemplo, impurezas orgánicas e inorgánicas, y residuos de solventes). Si los IFAs tienen una especificación de pureza microbiológica, deberán establecerse y cumplirse límites apropiados para el recuento de microorganismos, y ausencia de microorganismos objetables. Si los IFAs tienen una especificación para endotoxinas, deberán establecerse y cumplirse límites apropiados.

11.5 - Los controles de laboratorio deben documentarse en el momento de su ejecución. Toda desviación de los procedimientos descriptos deberá documentarse y justificarse.

11.6 - Todo resultado fuera de especificación (OOS) deberá ser investigado y documentado de acuerdo con un procedimiento. Dicho procedimiento requerirá análisis de datos, evaluación de la existencia de algún problema de relevancia, designación de acciones correctivas, y conclusiones. Todo re-muestreo y/o re-evaluación tras un OOS debe realizarse según un procedimiento documentado.

11.7 - Los reactivos y soluciones estándar deben prepararse y rotularse siguiendo procedimientos escritos. Deberá establecerse adecuadamente una fecha de vencimiento para reactivos y soluciones estándar.

11.8 - Para la elaboración de IFAs se deberá contar con un Estándar de Referencia Primario adecuado, cuya fuente deberá estar documentada. Deberán llevarse registros del almacenamiento y el uso de cada Estándar de Referencia Primario, de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Los Estándares de Referencia Primario provistos por una fuente reconocida oficialmente se usan normalmente sin evaluación previa, siempre que se hayan mantenido bajo las condiciones recomendadas por el proveedor.

11.9 - Cuando no se dispone un Estándar de Referencia Primario de una fuente reconocida oficialmente, deberá establecerse un "Estándar Primario de la casa". Este deberá evaluarse adecuadamente para establecer totalmente su identidad y pureza. Dicha evaluación se documentará de manera apropiada.

11.10 - Se deberá preparar, identificar, evaluar, aprobar y almacenar un Estándar de Referencia Secundario. La aptitud de cada lote del Estándar de Referencia Secundario debe determinarse antes de ser usado por primera vez, comparándolo con un estándar de referencia primario. Además, cada lote deberá ser re-evaluado periódicamente según un protocolo escrito.

Evaluación de IFAs e intermediarios

11.11 - Deben realizarse ensayos de laboratorio adecuados sobre cada lote de IFA e intermediarios para determinar su cumplimiento con las especificaciones.

11.12 - Para cada IFA se establecerá un perfil de impurezas describiendo las impurezas identificadas y no identificadas en un lote típico, producido bajo un proceso de producción controlado específico. Dicho perfil de impurezas deberá incluir un criterio de identidad (por ejemplo, tiempo de retención), el rango de cada impureza observada, y la clasificación de cada impureza identificada (por ejemplo, orgánica, inorgánica, solvente). Normalmente, el perfil de impurezas es dependiente del proceso de producción y del origen del IFA. El perfil de impurezas no suele ser necesario para IFAs de origen vegetal o proveniente de tejidos animales. Las consideraciones biotecnológicas se hallan descriptas en la ICH Guideline Q6B.

11.13 - El perfil de impurezas debe ser comparado, a intervalos adecuados, contra los datos históricos, a fin de detectar cambios en el IFA provenientes de modificaciones en el material de partida, en parámetros operativos de los equipos, o en el proceso de producción.

11.14 - Cuando exista una especificación de calidad microbiológica, sobre cada lote de IFA e intermediarios deberán realizarse los ensayos microbiológicos apropiados.

Certificados de Análisis

11.15 - Para cada lote de IFAs intermediarios deberá emitirse un certificado de análisis auténtico cuando éste sea solicitado.

11.16 - El certificado de análisis deberá proveer información acerca de nombre del IFA o intermediarios, número de lote, grado y fecha de liberación cuando estos correspondan. Para IFAs o intermediarios que posean fecha de vencimiento, ésta debe constar en el Certificado de Análisis y en el rótulo. Para IFAs o intermediarios que posean fecha de re-evaluación, ésta debe constar en el Certificado de Análisis y/o en el rótulo.

11.17 - El Certificado de Análisis debe incluir cada evaluación desarrollada de acuerdo con los requerimientos del cliente, incluyendo los límites de aceptación, y los resultados numéricos obtenidos, cuando correspondan.

11.18 - El Certificado de Análisis deberá estar fechado y firmado por personal autorizado del Departamento de Calidad, y en él debe constar el nombre, dirección y teléfono del elaborador original. Cuando el análisis lo haya llevado a cabo un reacondicionador o reprocesador, los datos (nombre, dirección y teléfono) que deberán constar en el Certificado de Análisis serán los de este último, y se añadirá además una referencia con el nombre del elaborador original.

11.19 - Si un nuevo Certificado de Análisis fuera emitido por o en nombre de un reacondicionador, reprocesador o agente, el Certificado deberá llevar los datos (nombre, dirección y teléfono) del laboratorio que realizó los análisis. Además deberá incluir una referencia con el nombre del elaborador original, y una copia del Certificado de Análisis original.

Monitoreo de la Estabilidad de IFAs

11.20 - Debe diseñarse un Programa

documentado de Monitoreo continuo a fin de controlar las características de estabilidad de los IFAs. Los resultados se utilizarán para confirmar las condiciones apropiadas de almacenamiento, y las fechas de re-evaluación y vencimiento.

11.21 - Los procedimientos usados en la evaluación de estabilidad deben estar validados y ser indicadores de la estabilidad.

11.22 - Las muestras para evaluación de estabilidad deben almacenarse en envases que simulen o se asemejen a los envases de venta.

11.23 - Normalmente, los primeros tres lotes comerciales de IFAs elaborados ingresan al Programa de Monitoreo para confirmar las fechas de re-evaluación y vencimiento. De cualquier forma, cuando los datos de estudios previos indiquen que el IFA es probablemente estable por al menos dos años, podrán ingresarse al Programa menos de tres lotes.

11.24 - A partir de entonces, se agregará al Programa al menos un lote de IFA por año (salvo que no se haya elaborado ninguno) para confirmar los datos de estabilidad.

11.25 - En el caso de productos con vida estable corta, la evaluación debe hacerse más frecuentemente. Por ejemplo, en el caso de productos biotecnológicos o bi ológicos cuya vida estable suele ser de un año o menos, la evaluación debe hacerse mensualmente durante los primeros tres meses, y a p artir de ahí, a intervalos de tres meses. Cuando existan datos que confirmen que la estabilidad del producto no está comprometida, se podrá considerar la eliminación o modificación de algunos intervalos.

11.26 - Cuando corresponda, las condiciones estables de almacenamiento deberán ser consistentes con la ICH Guideline de estabilidad.

Fechas de Re-evaluación y Vencimiento

11.27 - Cuando un producto debe transferirse fuera del sistema de gerenciamiento de calidad de los materiales del elaborador, y tiene asignada una fecha de re-evaluación, deberá disponerse de información adicional correspondiente a s u estabilidad (por ejemplo, fecha de publicación, resultados de la evaluación) que sustente los datos de estabilidad presentados.

11.28 - La fecha de re-evaluación o vencimiento deberá estar basada en la evaluación de datos obtenidos de estudios de estabilidad. Es de uso más común la fecha de re-evaluación que la de vencimiento.

11.29 - Pueden obtenerse datos preliminares de la fecha de re-evaluación o vencimiento a partir de lotes a escala piloto si: (1). El método y procedimiento de fabricación de l lote piloto simulan el proceso final a u tilizarse en la fabricación a escala comercial; y (2). La calidad del producto obtenido es representativa de aquel que se obtendrá a escala comercial.

11.30 - Deberá retenerse una muestra representativa de los lotes, que permita desarrollar la re-evaluación cuando corresponda.

Muestras de Retención o Reserva

11.31 - La finalidad de la toma de Muestras de Retención es permitir potenciales evaluaciones futuras de la calidad de los lotes de IFAs o intermediarios. No se utilizarán para futuras evaluaciones de estabilidad.

11.32 - Las Muestras de Retención se mantendrán, debidamente identificadas, hasta un año posterior a la fecha de vencimiento establecida por el elaborador, o hasta tres años posteriores a la fecha de distribución (entre ambos, se tomará el plazo más largo). Para IFAs con fecha de re-evaluación, se tomarán Muestras de Retención similares, las cuales se guardarán por tres años tras la completa distribución por parte del elaborador.

11.33 - Las Muestras de Retención deben almacenarse con el mismo sistema de envasado con el que se almacenen los IFAs a comercializar, o de alguna forma que lo proteja aún mejor. La cantidad de producto tomado como Muestras de Retención deberá ser suficiente como para permitir realizar al menos dos análisis completos según se describan en la monografía de la Farmacopea, o, de no hallarse descriptos, dos análisis completos según las especificaciones.

12. VALIDACIÓN

Política en Validación

12.1 - La política general de validaciones, su enfoque, criterios y formas de encarar el tema por la empresa en relación con Validación (incluyendo validación de procesos de producción, procedimientos de limpieza, métodos analíticos, controles durante los procesos, sistemas informáticos y personal responsable del diseño, revisión, aprobación y documentación de cada etapa de Validación), deberá estar documentada.

12.2 - Los parámetros críticos deberán estar

identificados a partir de la fase de desarrollo o de datos históricos, y deberán estar definidos los rangos requeridos para que las operaciones sean reproducibles. Esto incluirá:

a) Definir el IFA en término de sus atributos críticos.
b) Identificar los parámetros del proceso que pudieran afectar la calidad de dichos atributos críticos.
c) Determinar los rangos de operación para cada parámetro crítico del proceso que se utilizará rutinariamente durante la fabricación y el control del proceso.

12.3 - La Validación deberá extenderse a aquellas operaciones que son críticas para la calidad y la pureza de los IFAs.

Documentación de la Validación

12.4 - Deberá establecerse un protocolo de Validación escrito que especifique cómo debe llevarse a cabo la Validación de cada proceso en particular. Dicho protocolo deberá estar revisado y aprobado por el Departamento de Calidad y por algún otro Departamento designado.

12.5 - EL protocolo de Validación deberá especificar los pasos críticos del proceso y los criterios de aceptación, así como el tipo de Validación que se llevará a cabo (por ejemplo, Retrospectiva, Prospectiva, Concurrente), y el número de corridas del proceso.

12.6 - Deberá realizarse un reporte de Validación que resuma los resultados obtenidos, que comente toda desviación observada y exprese las conclusiones apropiadas, incluyendo las modificaciones recomendadas para corregir las deficiencias existentes.

12.7 - Toda variación del protocolo de Validación deberá documentarse con la justificación correspondiente.

Calificación

a) 12.8 Antes de comenzar con las actividades relacionadas con los procesos de Validación, se deberá llevar a cabo la Calificación de los equipos críticos y de los sistemas auxiliares. La Calificación normalmente se lleva a cabo realizando las siguientes actividades, en forma individual o combinada:

b) CD (Calificación del Diseño): verificación documentada de que el diseño propuesto de las instalaciones, equipamiento o sistemas es adecuado para su propósito.
c) CI (Calificación de la/s Instalación/es): verificación documentada de que el equipamiento o sistemas, tal como se hallan instalados o con alguna modificación, cumplen tanto con el diseño aprobado, como con las recomendaciones del fabricante y/o con los requerimientos del usuario.
d) CO (Calificación Operacional): verificación documentada de que el equipamiento o sistemas, tal como se hallan instalados o con alguna modificación, se desempeñan según corresponde a su diseño y especificación en todos los rangos de operación predeterminados.
e) CP/PQ (Calificación de Desempeño/Performance): verificación documentada de que el equipamiento y los sistemas auxiliares, tal como se hallan instalados y conectados entre sí, pueden desempeñarse en forma eficiente y reproducible, basándose en los procesos y especificaciones aprobadas.

Enfoques del Proceso de Validación

12.9 - El Proceso de Validación es la evidencia documentada de que el proceso, operado según parámetros preestablecidos, puede desempeñarse en forma eficiente y reproducible para producir un IFA o intermediario que cumple con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

12.10 - Existen tres enfoques para la Validación. El enfoque preferido es el Prospectivo, pero hay casos en los que se pueden usar otros enfoques, detallándose estos a continuación.

12.11 - La Validación Prospectiva se lleva a cabo normalmente en todos los procesos para IFAs según 12.2. La Validación Prospectiva sobre un proceso para IFAs debe estar finalizada antes de la distribución comercial del producto terminado fabricado a partir de dicho IFAs.

12.12 - La Validación Concurrente puede realizase cuando no se dispone de suficientes datos replicados de la producción de distintos lotes de IFAs, a causa de la elaboración de un número limitado de lotes, o de la producción poco

frecuente, o de la producción a través de un proceso validado diferente. La distribución comercial del producto terminado fabricado a partir de este IFA podrá realizarse antes de que se concluya la Validación Concurrente, basándose en la minuciosa evaluación y monitoreo de los lotes del IFA.

12.13 - La Validación Retrospectiva podrá usarse en casos de excepción, para procesos en los que está bien establecido que no se han detectado cambios significativos en la calidad del IFA cuando en su elaboración hubo alguna variación en el material de partida, los equipamientos, los sistemas, las instalaciones, o el proceso de producción. Este enfoque podrá usarse si se cumple con todos los siguientes ítems:

a) Se hallan identificados los atributos críticos de calidad y los parámetros críticos del proceso.

b) Se han establecido controles y criterios de aceptación apropiados durante el proceso.

c) No han habido fallas significantivas en el producto o en el proceso por causas distintas a errores del operador o fallas del equipo sin relación con la adecuada operatividad de éste.

d) Se han establecido perfiles de impurezas para el IFA.

12.14 - Los lotes sobre los que se realizará una Validación Retrospectiva deberán ser representativos de todos los lotes fabricados durante el período en estudio(incluyendo los lotes que han quedado fuera de especificación), y el número de lotes utilizado deberá ser suficiente como para demostrar la consistencia del proceso. Las muestras de retención pueden ser utilizadas para evaluar el proceso en forma retrospectiva.

Programa de Validación de Procesos

12.15 - El número de corridas del proceso necesarias para la Validación dependerá de la complejidad del proceso o de la magnitud del cambio en el proceso. Para la Validación Prospectiva y la Concurrente, pueden usarse tres lotes sucesivos producidos exitosamente, pero puede haber casos en los que puede necesitarse un número mayor a causa de la complejidad del proceso. Para la Validación Retrospectiva generalmente se analizan los datos de diez a treinta lotes consecutivos, pero podrán analizarse menos lotes si se lo justifica debidamente.

12.16 - Los parámetros críticos del proceso deben controlarse y monitorearse durante los estudios de Validación. Los parámetros no relacionados con la calidad no precisan ser incluidos en la Validación.

12.17 - La Validación debe confirmar que el perfil de impurezas papa cada IFA se encuentra dentro de los límites especificados. El perfil de impurezas debe ser similar o mejor que los datos históricos, cuando corresponda, se lo usará para estudios clínicos y toxicológicos.

Revisión Periódica de los Sistemas Validados

12.18 - Los sistemas y los procesos deberán ser evaluados periódicamente para verificar que continúan trabajando en forma validada. Cuando no se verifiquen cambios significativos y se confirme que se está trabajando en forma consistente y dentro de las especificaciones, no será necesario realizar una revalidación.

Validación de Limpieza

12.19 - Los procedimientos de limpieza normalmente deben ser validados. Esta Validación está dirigida a las situaciones o etapas del proceso donde la contaminación de los materiales representa un mayor riesgo para la calidad del IFA. (por ejemplo, al inicio de la producción es importante evaluar la remoción de residuos anteriores).

12.20 - La Validación de los procedimientos de limpieza debe reflejar el patrón de uso de los equipos. Si distintos IFAs o intermediarios se elaboran en el mismo equipo y la limpieza de éste se realiza de igual forma, se elegirá un producto representativo para la validación de la limpieza. Dicha elección se basará en la solubilidad, la dificultad de la limpieza, y en el cálculo del límite de residuos basado en la potencia, la toxicidad, y la estabilidad.

12.21 - EL protocolo de Validación de limpieza debe describir el equipo a ser limpiado, el procedimiento, los materiales, los niveles aceptables de limpieza, los parámetros a monitorear y los métodos analíticos. También debe indicar el tipo de muestras a tomar y como deben estas ser tomadas y rotuladas.

12.22 - El muestreo debe incluir frotado, enjuague u otro método adecuado para detectar residuos solubles e insolubles. La técnica debe permitir evaluar cuantitativamente los niveles de los residuos remanentes en las superficies del equipo después de ser limpiado. El muestreo por frotado

será impracticable en los casos en que la superficie en contacto con el producto es inaccesible.

12.23 Deberán usarse métodos analíticos validados con sensibilidad suficiente como para detectar residuos o contaminantes. Deberá establecerse el nivel de recuperación obtenido con ese método. El límite de residuos deberá ser alcanzable, verificable, práctico, y basado en el residuo de efecto más deletéreo. Los límites se podrán establecer basándose en la mínima actividad farmacológica, toxicológica, o fisiológica conocida del IFA o su componente más deletéreo.

12.24 - En aquellos procesos en los que existe la necesidad de reducir recuentos microbianos totales o de endotoxinas y e l IFA posee límites microbiológicos o de endotoxinas, los estudios de limpieza o s anitización de los equipos deben apuntar a d ichas contaminaciones (por ejemplo IFAs no estériles utilizados para fabricar productos estériles)

12.25 - Tras la Validación, los procedimientos de limpieza deben ser monitoreados a i ntervalos adecuados a fin de asegurar que se están realizando eficientemente. La limpieza de los equipos puede verificarse por controles analíticos y por examen visual, cuando sea posible. La inspección visual permite detectar altos niveles de contaminación concentrada en pequeñas áreas que pasarían inadvertidas mediante muestreos y/o análisis

Validación de Métodos Analíticos

12.26 - Los métodos analíticos deberán ser validados a menos que la técnica empleada esté incluida en la Farmacopea o en algún otro Código de Referencia reconocido. No obstante, la aptitud de todos los métodos de evaluación utilizados debe ser verificada y documentada bajo las condiciones de uso actuales.

12.27 - Los métodos analíticos deberán ser validados considerando las características incluidas en la ICH Guideline referentes a validación de métodos analíticos. El grado de validación desarrollado deberá reflejar el propósito del análisis y la etapa del proceso de producción del IFA.

12.28 - Debe considerarse que los equipos estén adecuadamente calificados antes de comenzar con la Validación de los métodos analíticos.

12.29 - Deberán llevarse registros completos de toda modificación hecha sobre un método analítico validado. Dichos registros deberán incluir la causa de la modificación y los datos adecuados para verificar que la modificación genera resultados exactos y confiables.

13. CONTROL DE CAMBIOS

13.1 - Deberá establecerse un sistema formal de control de cambios para evaluar todo cambio que pueda afectar la producción y el control de un IFA o intermediario.

13.2 - Deberán existir procedimientos escritos para la identificación, documentación, revisión y aprobación de cambios en las materias primas, en las especificaciones, en los métodos analíticos, en las instalaciones, en los sistemas de soporte, en los equipos (incluyendo el hardware), en las etapas del procesos, en el envasado y rotulado, y en el software.

13.3 - Toda propuesta acerca de cambios relevantes en las GMP debe ser esbozada, revisada y aprobada por la mas alta Unidad de Calidad, y además será revisada y aprobada por el Departamento de Calidad.

13.4 - Se deberá evaluar el impacto potencial del cambio propuesto sobre la calidad del IFA o el intermediario. Para determinar el nivel de evaluación, validación y documentación necesarias para justificar el cambio en un proceso validado, puede ser de ayuda un pr ocedimiento de clasificación. Los cambios pueden clasificarse (por ejemplo, menor o mayor) dependiendo de la naturaleza y la extensión de los cambios, y de los efectos que esos cambios pueden causar en el proceso. Las evaluaciones y estudios validados adicionales necesarios para justificar el cambio se determinarán según juicio científico.

13.5 - Cuando se implementan cambios ya aprobado deben tomarse medidas para asegurar que todos los documentos afectados por el cambio fueron revisados.

13.6 - Tras la implementación de cambios deberá realizarse una evaluación de los primeros lotes producidos o a nalizados luego de dichos cambios.

13.7 - En el caso de cambios críticos deberá evaluarse el impacto potencial sobre las fechas de re-evaluación y vencimiento establecidas. De ser necesario, se tomarán muestras del IFA o intermediario producido bajo el proceso ya modificado las cuales podrán ingresar en un programa de estudio de estabilidad acelerado y/o ser agregadas al programa de monitoreo de estabilidad.

13.8 - Los fabricantes de los productos farmacéuticos terminados deberán ser notificados de los cambios en los procedimientos de producción y de control de procesos que puedan impactar en la calidad del IFA.

14. RECHAZO Y REUTILIZACIÓN DE MATERIALES

Rechazo

14.1 - Los IFAs e i ntermediarios que no cumplieran con las especificaciones deberán ser apropiadamente identificados y puestos en cuarentena. Dichos productos podrán ser reprocesados o reelaborados según se describe a continuación. El destino final de los productos rechazados deberá ser documentado.

Reprocesamiento

14.2 - Normalmente se considera como aceptable la reinserción dentro del proceso de un IFA o i ntermediario (incluyendo los que no cumplen con las especificaciones) y su reprocesamiento por medio de la repetición de un paso de recristalización u otro paso físico o químico (por ejemplo, destilación, filtración, cromatografía, molienda). Sin embargo, si dicho reprocesamiento se usa en la mayoría de los lotes, el proceso deberá incluirse dentro del proceso estándar de elaboración.

14.3 - La continuación de una etapa que se hallaba en curso tras un control en proceso que mostró que esta etapa se hallaba incompleta se considerará como parte del proceso normal y no como un reprocesamiento.

14.4 - La reinserción dentro del proceso de un material que no reaccionó y la repetición de la reacción química se considerará como un reprocesamiento a menos que sea parte del proceso establecido. Dicho reprocesamiento deberá estar precedido por una evaluación exhaustiva a fin de asegurar que la calidad del IFA o intermediario no se verá modificada por la posible formación de productos relacionados o s ustancias que han reaccionado en exceso.

Re-elaboración

14.5 - Antes de tomar la decisión de reelaborar un lote que no cumple con las especificaciones deberá realizarse una investigación acerca de la razón por la cual se dio dicho incumplimiento.

14.6 - Los lotes que han sido re-elaborados deberán ser adecuadamente evaluados y documentados a f in de verificar que su calidad es equivalente a la de los lotes elaborados normalmente. Para los procesos de re-elaboración suele ser adecuada una Validación Concurrente. Deberá redactarse un protocolo que defina el procedimiento de re-elaboración, que lo describa y especifique los resultados esperados. Si sólo es un lote el que debió ser re-elaborado, será suficiente con escribir un reporte, y la liberación se autorizará una vez que el lote se evalúe como aceptable.

14.7 - Debe contarse con un perfil de impurezas que permita comparar el lote re-elaborado con los lotes obtenidos por el proceso establecido. Cuando los métodos analíticos no sean adecuados para caracterizar el lo te re-elaborado, deberán usarse métodos adicionales.

Recuperación de Materiales y Solventes

14.8 - La recuperación de reactivos, de IFAs o los intermediarios (por ejemplo, de una solución madre o de un filtrado) se considera aceptable siempre que existan procedimientos aprobados y que los productos recuperados cumplan con las especificaciones adecuadas para el uso propuesto.

14.9 - Los solventes pueden ser recuperados y reutilizados en los mismos procesos o en procesos diferentes, siempre que, antes de ser utilizados o mezclados con otros solventes ya aprobados, se realicen controles y monitoreos s obre los procedimientos de recuperación de los mismos que aseguren que cumplen con los estándares adecuados.

14.10 - Los reactivos o solventes frescos y recuperados podrán ser mezclados si los resultados del control analítico indican que cumplen con los requisitos para el uso propuesto

14.11 - El uso de materiales recuperados deberá estar adecuadamente documentado.

Devoluciones

14.12 - Los IFAs o i ntermediarios que se devolverán deberán ser identificados como tales y puestos en cuarentena.

14.13 - Si las condiciones en las que los productos a devolver han sido almacenados o transportados, o las condiciones de los contenedores, , generan dudas acerca de su calidad, antes o du rante su retorno, dichos productos deberán ser reprocesados, reelaborados o destruidos según corresponda.

14.14 - Deberán llevarse registros de los IFAs o

intermediarios devueltos. Por cada devolución, la documentación deberá incluir:

1) Nombre y dirección del depositario

2) Nombre del IFA o intermediario, número de lote, y cantidad devuelta.

3) Razón de la devolución.

4) Uso o destino del IFA o intermediario devuelto.

15. RECLAMOS Y RETIRO DEL MERCADO

15.1 - Todo reclamo relacionado con la calidad, ya sea recibido en forma oral o escrita, deberá ser registrado e investigado según un procedimiento escrito.

15.2 - El registro de un reclamo debe incluir:

1. Nombre y dirección del reclamante;
2. Nombre, título y teléfono de la persona que presentó el reclamo;
3. Naturaleza del reclamo (incluyendo nombre y lote del IFA);
4. Fecha de recepción del reclamo;
5. Acción tomada inicialmente (incluyendo fechas e identidad de la persona que inició la acción) y toda acción subsiguiente;
6. Respuesta dada al reclamante;
7. Decisión final tomada sobre el lote del IFA.

15.3 - Se llevarán registros de los reclamos que permitirán analizar tendencias, frecuencias relacionadas con el producto, y severidad; a fin de tomar medidas correctivas inmediatas de ser necesario.

15.4 - Deberán existir procedimientos escritos que definan bajo qué circunstancias se considerará realizar el Retiro del mercado de un IFA o intermediario.

15.5 - El procedimiento del Retiro del mercado debe definir quién será responsable de evaluar la información, cómo se iniciará el Retiro del mercado, quién debe ser informado acerca del Retiro del mercado, y cómo se tratará el material recuperado.

15.6 - Ante una situación grave o de potencial riesgo de vida, las autoridades locales, nacionales o internacionales deberán ser informadas y se les solicitará consejo al respecto.

16. ELABORACION Y/O ANÁLISIS POR CONTRATO

16.1 - Todos los elaboradores contratados deben cumplir con las normas BPF definidas en esta guía. Debe tenerse especial consideración acerca de la prevención de contaminaciones cruzadas y el seguimiento de la trazabilidad.

16.2 - Los elaboradores contratados deben ser evaluados por el contratante acerca del cumplimiento de las BPF en las operaciones específicas que se llevan a cabo en le sitio contratado.

16.3 - Debe existir un contrato escrito y aprobado o acuerdo formal entre contratante y contratado que defina en detalle las responsabilidades de cada parte acerca de las BPF.

16.4 - El contrato debe permitir que el contratante audite las instalaciones del contratado en relación con el cumplimiento de las BPF.

16.5 - Cuando se autoriza la existencia de un subcontratado, el contratado no debe confiarle a aquel más de la tercera parte del trabajo que se le encomendó, sin la evaluación y aprobación del contratante.

16.6 - Deberán llevarse registros del elaborador o el laboratorio en el sitio en el que se desarrollan las actividades, y éstos deberán estar siempre disponibles para ser consultados.

16.7 - No se podrá realizar ningún cambio en los procesos, equipamiento, métodos de evaluación, especificaciones, u otros requerimientos contractuales sin la aprobación previa del contratante.

17. AGENTES, CORREDORES, COMERCIANTES, DISTRIBUIDORES, Y REACONDICIONADORES

Aplicación

17.1 - Esta sección se aplicará a la contraparte del elaborador original, que pueda comercializar y/o poseer, re-envasar, re-rotular, manipular, distribuir o almacenar IFAs o intermediarios.

17.2 - Todos los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores deberán cumplir con las normas BPF según se describe en esta guía.

17.3 - Los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores deberán

mantener una completa trazabilidad de los productos que distribuyen. Esta documentación deberá hallarse siempre disponible, y deberá incluir:

1. Identidad y dirección del elaborador original;
2. Orden de compra;
3. Documento de transporte;
4. Documento de recepción;
5. Nombre del IFAs o intermediario;
6. Número de lote del fabricante;
7. Registros de transporte y distribución;
8. Todos los certificados de análisis auténticos, incluyendo los del elaborador original;
9. Fecha de re-evaluación o vencimiento.

Gerencia de Calidad

17.4 - Los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores deberán establecer, documentar e implementar un sistema efectivo de gerenciamiento de la calidad, según se especifica en la sección 2.

Re-envasado, Re-rotulado y Posesión de IFAs e Intermediarios

17.5 - El re-envasado, re-rotulado y posesión de IFAs e intermediarios debe llevarse acabo bajo las adecuadas normas BPF, según consta en esta guía, a fin de evitar confusiones o pérdidas de la pureza o la identidad de IFAs e intermediarios.

17.6 - El re-envasado debe realizarse bajo las adecuadas condiciones ambientales a fin de evitar contaminaciones comunes o cruzadas.

Estabilidad

17.7 - Si un IFA o intermediario es reempacado en un tipo de envase diferente del usado por el elaborador original, deberán realizarse estudios que verifiquen la fecha de re-evaluación o vencimiento asignada.

Transferencia de Información

17.8 - Los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores deberán transferir al cliente toda la información regulatoria o relacionada con la calidad del producto recibida del elaborador o un intermediario, así como del cliente al elaborador o intermediario.

17.9 - Los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores que provean IFAs o intermediarios a un cliente, deberán informarle el nombre y el número de lote del producto provisto.

17.10 - Los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores también deberán informar la identidad del elaborador original a las autoridades regulatorias cuando así lo requieran. El elaborador original puede responder ante las autoridades regulatorias en forma directa o a través de agentes autorizados por el elaborador, dependiendo de la relación entre el elaborador y dichos agentes.

17.11 - Deberá cumplirse con la guía específica para Certificados de Análisis incluida en la sección "Certificados de análisis".

Manejo de Reclamos y Retiros del mercado

17.12 - Los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y reacondicionadores deberán llevar registros de los reclamos y Retiro del mercado según se especifica en la sección 15.

17.13 - Si la situación lo justifica, los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores deberán evaluar el reclamo a fin de determinar alguna posible acción a iniciar ya sea hacia otros clientes que pudieran haber recibido el mismo IFAs, o hacia las autoridades regulatorias, o ambos. La investigación sobre la causa del reclamo será llevada a cabo y documentada por la parte que corresponda.

17.14 Cuando se transfiere un reclamo al elaborador original, el registro que llevan los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores deberá incluir la respuesta recibida por parte el elaborador, así como la fecha y la información provista.

Manejo de las Devoluciones

17.15 - Las devoluciones deberán manejarse como se detalla en la sección 14 "Devoluciones". Los agentes, corredores, comerciantes, distribuidores, y re-acondicionadores deberán llevar registro documentado de las devoluciones de IFAs e intermediarios.

18.- GUÍA ESPECÍFICA PARA IFAS FABRICADAS POR CULTIVO/FERMENTACIÓN CELULAR

Introducción

18.1 - Esta sección apunta a los controles específicos a realizarse sobre IFAs o intermediarios

elaborados por cultivo celular o fermentación, utilizando organismos naturales o recombinantes, lo cual no ha sido adecuadamente cubierto en secciones anteriores. No pretende ser tomada como una sección aislada, en general las normas BPF de las secciones previas son aplicables en esta también. Nótese que los principios fermentativos de los procesos "clásicos" para producción de moléculas pequeñas y de los procesos que utilizan organismos recombinantes o no recombinantes para producción de proteínas y/o polipéptidos, son los mismos. Sin embargo, el grado de control será diferente, y esta sección apuntará a esas diferencias. En general el grado de control sobre procesos biotecnológicos usados para obtener proteínas o polipéptidos es mayor que sobre fermentaciones clásicas.

18.2 - El término "procesos biotecnológicos" se refiere al uso de células u organismos que han sido generados o modificados utilizando técnicas de ADN recombinante, o hibridomas u otra técnica para producir IFAs. Los IFAs producidos por procesos biotecnológicos normalmente consisten en sustancias de alto peso molecular, como proteínas y polipéptidos, para los cuales se da la guía específica en esta sección. Ciertos IFAs de bajo peso molecular como antibióticos, aminoácidos, vitaminas y carbohidratos pueden también producirse por tecnología de ADN recombinante. EL nivel de control para estos productos es similar al aplicado sobre fermentaciones clásicas.

18.3 - El término "fermentaciones clásicas" se refiere a procesos que utilizan microorganismos tal como existen en la naturaleza y/o modificados por métodos convencionales (por ejemplo, irradiación o mutagénesis dirigida) para producir IFAs. Estos IFAs normalmente son de bajo peso molecular como antibióticos, aminoácidos, vitaminas y carbohidratos.

18.4 - La producción de IFAs o intermediarios a partir de cultivos celulares o fermentación involucra procesos biológicos tal como el cultivo de las células y la extracción o la purificación de material a partir de los organismos vivos. Nótese que puede ser que involucre otros pasos adicionales que forman parte del proceso de elaboración, como modificaciones fisicoquímicas. Los materiales de partida usados (medios de cultivo, buffers) pueden ser una fuente potencial de contaminantes biológicos. Dependiendo de la fuente, del método de preparación y del uso que se le dará al IFAs o intermediario, puede ser necesario realizar controles de carga biológica, contaminación viral y/o endotoxinas durante la elaboración, y monitorear el proceso en las etapas apropiadas.

18.5 - Deberán establecerse controles adecuados en todas las etapas de elaboración a fin de asegurar la calidad del IFAs o intermediario. Mientras que esta guía se aplica al proceso a partir del paso de cultivo o fermentación, los pasos previos (como el desarrollo del banco celular) deberán llevarse a cabo bajo los apropiados controles del proceso. Esta guía tendrá aplicación a partir del momento en que un vial de células es retirado del banco celular para ser usado en elaboración.

18.6 - Deberán realizarse controles ambientales y del equipamiento a fin de minimizar todo riesgo de contaminación. El criterio de aceptación para la calidad del medio ambiente y la frecuencia de su monitoreo dependerá de la etapa de producción y de las condiciones en que se lleva a cabo (Sistema cerrado, abierto o contenido).

18.7 - En general, los controles del proceso deben tener en cuenta:

- Mantenimiento del Banco de Células de trabajo (cuando corresponda).
- Inoculación y expansión adecuadas del cultivo.
- Control de los parámetros operativos críticos durante el cultivo o la fermentación.
- Monitoreo del proceso en relación con el crecimiento celular, la viabilidad y la productividad, cuando estos correspondan.
- Implementar procedimientos de extracción y purificación que remuevan células, desechos celulares y componentes del medio, a fin de proteger el IFAs de alteraciones de la calidad y de toda contaminación, principalmente microbiológica.
- Monitoreo de la carga biológica y, cuando sea necesario, de niveles de endotoxinas, en las etapas apropiadas de producción.
- La seguridad viral aplicable es la descripta en la ICH Guideline Q5A (Calidad de Productos Biotecnológicos)

18.8 - Cuando sea apropiado, deberá demostrarse la remoción de componentes del medio, proteínas de la célula huésped, impurezas relacionadas con el proceso o con el producto, y otros contaminantes.

Mantenimiento del Banco Celular y Registros

18.9 - El acceso al banco celular deberá limitarse a personal autorizado.

18.10 - El banco celular deberá mantenerse bajo condiciones de almacenamiento designadas para mantener la viabilidad y evitar la contaminación.

18.11 - Deben llevarse registros del uso de los viales del banco celular y de las condiciones de almacenamiento.

18.12 - Cuando corresponda, el banco celular deberá ser periódicamente monitoreado a f in de determinar su aptitud para su uso.

18.13 - Para una más completa discusión acerca del banco celular ver la ICH Guideline Q5A (Calidad de Productos Biotecnológicos).

Cultivo Celular y Fermentación

18.14 - uando sea necesaria la adición aséptica de sustratos celulares, medio de cultivo, buffers o gases, deberá usarse de ser posible un Sistema contenido o cerrado. Si la inoculación inicial o transferencias o adiciones posteriores se realizan en recipientes abiertos, deberán existir procedimientos y controles a f in de minimizar el riesgo de contaminación.

18.15 - Cuando la calidad del IFAs puede afectarse por contaminación microbiana, la manipulación con recipientes abiertos deberá realizarse en un flujo laminar u o tro ambiente controlado similar.

18.16 - El personal deberá estar vestido adecuadamente, y tomará precauciones especiales en el manipuleo de los cultivos.

18.17 - Se deberán monitorear los parámetros operativos críticos (temperatura, pH, velocidad de agitación, adición de gases, presión) a f in de asegurar la consistencia con el proceso establecido. Otros parámetros a monitorear cuando correspondan serán: crecimiento celular, viabilidad y productividad. Los parámetros críticos podrán variar de un proceso a otro, y para la fermentación clásica ciertos parámetros pueden no necesitar monitoreo (como viabilidad celular).

18.18 - El equipamiento para cultivo celular deberá ser limpiado y esterilizado después de cada uso. El equipamiento para fermentación, cuando sea apropiado deberá ser limpiado y sanitizado o esterilizado.

18.19 - Cuando sea apropiado, el medio de cultivo deberá ser esterilizado antes de ser usado, a fin de proteger la calidad del IFAs.

18.20 - Deberán existir procedimientos adecuados a fin de detectar contaminaciones, y establcer las acciones a t omar en dicho caso. Deberá incluir procedimientos para determinar el impacto de la contaminación sobre el producto, y para descontaminar el equipo y retornar a l as condiciones de uso para lotes sucesivos. Los microorganismos extraños detectados durante la fermentación deberán ser identificados , y evaluado su efecto sobre la calidad del producto. El resultado de esta evaluación se tendrá en consideración para decidir el destino del producto elaborado.

18.21 - Deberán llevarse registros de los eventos de contaminación.

18.22 - Los equipamientos multiproductos (que se utilizan en varias elaboraciones distintas) deberán sufrir evaluaciones adicionales tras la limpieza realizada para cambiar de producto, a fin de minimizar el riesgo de contaminación cruzada.

Extracción, Aislamiento y Purificación

18.23 - Los pasos de extracción, ya sean para la remoción de células o componentes celulares, como para la recolección de componentes celulares tras la disrupción celular, debe llevarse a cabo en equipos y áreas designadas a fin de minimizar el riesgo de contaminación.

18.24 - Los procedimientos de extracción y purificación que remueven o inactivan el microorganismo productor, o desechos celulares, o componentes del medio de cultivo deben ser adecuados de forma de asegurar el mantenimiento de la calidad del IFAs o intermediario elaborado.

18.25 - Todos los equipamientos deberán ser adecuadamente limpiados y sanitizados después de su uso. Sin embargo podrán elaborarse varios lotes sucesivos sin limpiar entre ellos si se demuestra que esto no compromete la calidad del IFAs.

18.26 - Si se están utilizando Sistemas abiertos, la purificación deberá realizarse bajo condiciones ambientales apropiadas a fin de preservar la calidad del producto.

18.27 - Si se utilizan equipamientos multiproductos puede ser necesario implementar controles adicionales.

Etapas de Remoción o Inactivación Viral

18.28 - Para mayor información ver la ICH Guideline Q5A (Calidad de Productos

Biotecnológicos).

18.29 - Las etapas de remoción o inactivación viral son pasos críticos en algunos procesos y deben llevarse a cabo dentro de sus parámetros validados.

18.30 - Deberán tomarse las precauciones pertinentes para prevenir la contaminación viral desde los pasos previos a la remoción/inactivación hacia los pasos posteriores. Por ese motivo, los procesos en Sistemas abiertos deberán realizarse en áreas separadas y tener diferentes unidades de ventilación o acondicionamiento del aire.

18.31 - No es común que se utilice el mismo equipo en diferentes pasos de la purificación, sin embargo si esto ocurriera, dicho equipo deberá ser adecuadamente limpiado y sanitizado antes de su reutilización. Deberán tomarse las precauciones apropiadas para prevenir potenciales transferencias de virus desde pasos previos.

19. IFAs PARA USO EN ENSAYOS CLINICOS

Generalidades

19.1 - No todos los controles de las secciones previas de esta guía son adecuados para la fabricación de un nuevo IFA que se usará en investigación durante su desarrollo.

19.2 - Los controles usados en la fabricación de IFAs para usar en ensayos clínicos deberán ser consistentes con la etapa de desarrollo del producto droga que incorporará al IFA. Los procedimientos de proceso y testeo deberán ser flexibles para facilitar cambios a medida que aumenta el conocimiento del proceso y del testeo clínico de un producto droga progresando desde las etapas pre-clínicas hasta las etapas clínicas. C uando el desarrollo de la droga alcanza la etapa en la que el IFA es producido para usarlo en productos drogas destinado a ensayos clínicos, los fabricantes deberán asegurar que los IFAs son fabricados en instalaciones aptas, utilizando procedimientos apropiados de producción y de control para asegurar la calidad del IFA.

Calidad

19.3 - Se deberán aplicar conceptos apropiados de BPF en la fabricación de IFAs para uso en ensayos clínicos con un mecanismo adecuado de aprobación para cada lote.

19.4 - Una unidad de calidad independiente de la producción deberá establecerse para la aprobación o rechazo de cada lote de IFAs para usar en los ensayos clínicos

19.5 - Alguna de las funciones de testeo comúnmente llevadas a cabo por la o las unidades de calidad puede ser realizada dentro de otras unidades organizacionales.

19.6 - Las mediciones de calidad deberían incluir un sistema para el control d e materias primas, materiales de envasado, intermediarios, e IFAs.

19.7 - Todos los problemas de procesamiento y calidad deberán ser evaluados.

19.8 - El etiquetado de IFAs destinados al uso en ensayos clínicos deberá ser adecuadamente controlado y se deberá identificar el material como destinado a uso en investigación

Equipamiento e Instalaciones

19.9 - Durante todas las fases del desarrollo clínico, incluyendo el uso de instalaciones de pequeña escala o laboratorios para fabricar lotes de IFAs para utilizar en ensayos clínicos, los procedimientos deberán realizarse asegurando que el equipo se encuentra calibrado, limpio y es adecuado para el uso propuesto.

19.10 - Los procedimientos para el uso de instalaciones deberán asegurar que los materiales son manipulados de forma que minimice el riesgo de contaminación y de contaminación cruzada.

Control de Materiales de Partida

19.11 - Los materiales de partida utilizados en la producción de IFAs para uso en ensayos clínicos deberán ser evaluados, o y a recibidos con certificados de análisis del proveedor y sujetos a ensayos de identidad. Cuando un material es considerado riesgoso, el análisis del proveedor debería ser suficiente.

19.12 - En algunas instancias, la aptitud de la materia prima puede ser determinada antes de su uso, basándose en la aceptabilidad de las mismas mediante reacciones en pequeña escala (ej testeo de uso) más qu e sobre controles analíticos exclusivamente.

Producción

19.13 - La producción de IFAs para uso en ensayos clínicos deberá ser documentada en los libros de laboratorio, registros de lotes, o por otro medio apropiado. Estos documentos deberán incluir información sobre el uso de los materiales de producción, equipamiento, proceso, y

observaciones científicas.

19.14 - Los rendimientos esperados pueden ser más variables y menos definidos que los rendimientos esperados utilizados en los procesos comerciales. No se prevén investigaciones sobre las variaciones de rendimiento.

Validación

19.15 - Un proceso de validación para la producción de IFAs a ser utilizados en ensayos clínicos es normalmente inapropiado cuando se produce un solo lote de IFAs o cuando el cambio del proceso durante el desarrollo del IFAs hace difícil o inexacta la replicación de un lote. La combinación de controles, calibración, y donde sea apropiado, un equipo calificado, aseguran la calidad del IFAs durante esta fase del desarrollo

19.16 - Los procesos de validación deberán ser conducidos de acuerdo con la Sección 12 como cuando los lotes son producidos para uso comercial, aun cuando tales lotes sean producidos en pequeña escala o escala piloto.

Cambios

19.17 - Son previsibles los cambios durante el desarrollo, en la medida en que se gana conocimiento y la escala de producción aumenta. Cada cambio en la producción, especificaciones o procedimientos de ensayo deberá ser registrado adecuadamente.

Controles de Laboratorio

19.18 - En tanto los métodos analíticos destinados a evaluar un lote de IFA para ensayos clínicos no puedan aun ser validados, deberán ser científicamente aptos.

19.19 - Debe establecerse un sistema para guardar muestras de retención de todos los lotes. Este sistema debe asegurar que una cantidad suficiente de cada muestra de retención queda durante un período de tiempo apropiado después de la aprobación, terminación o discontinuación de un producto.

19.20 - La fecha de vencimiento y re-evaluación tal como se define en la sección "Fechas de re-evaluación y vencimiento" es pertinente para los IFAs ya existentes utilizados en ensayos clínicos. Para IFAs nuevos, la Sección "Fechas de re-evaluación y vencimiento" normalmente no se aplicará en las etapas iniciales de los ensayos clínicos.

Documentación

19.21 - Debe ponerse en práctica un sistema para asegurar que se documenta y está disponible la información obtenida durante el desarrollo y la fabricación de los IFAs a utilizar en ensayos clínicos.

19.22 - Se debe documentar apropiadamente el desarrollo e implementación de los métodos analíticos utilizados para respaldar la liberación de un lote de IFA para ser utilizado en ensayos clínicos.

19.23 - Deberá utilizarse un sistema para resguardar los registros de producción y control y la documentación. El sistema deberá asegurar que se resguarden los registros y documentos durante un tiempo suficientemente largo después de la aprobación, terminación o discontinuidad de un producto.

GLOSARIO

IFA (Ingrediente farmacéutico activo) - Droga activa - Cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a ser usada en la fabricación de un producto medicinal y que, cuando es utilizada en la producción de una droga, se transforma en ingrediente activo del producto elaborado.

Tales sustancias están destinadas a proveer actividad farmacológica u otro efecto directo en el diagnóstico, cura, alivio, tratamiento, o prevención de enfermedades o para influenciar sobre la estructura y función del cuerpo.

Auxiliares de proceso - Materiales, excluyendo solventes, utilizados como ayuda en la fabricación de un intermediario o IFA, que no participan en si mismos en una reacción química o biológica (ej. ayuda de filtrado, carbón activado, etc.)

Calibración - La demostración que produce un instrumento o dispositivo particular, dentro de limites específicos, por comparación con aquellos producidos por un Estándar de Referencia o sustancia detectable, a través de un rango apropiado de mediciones

Calificación o aptitud - Acción de probar y documentar que los equipos y sistemas auxiliares están instalados adecuadamente, trabajan correctamente, y efectivamente conducen a los resultados esperados. La calificación o aptitud es parte de la validación, pero las etapas individuales de aptitud por si solas no constituyen un proceso de validación.

Carga biológica - El nivel y tipo (sea objetable o no) de microorganismos que pueden estar

presentes en las materias primas, materiales de partida IFAs, intermediarios o IFAs. L a carga biológica puede no ser considerada contaminación a menos que los niveles hayan excedido o se hayan detectado organismos objetables definidos.

Contaminación - La introducción indeseada de impurezas de naturaleza química o microbiológica, o de una sustancia extraña, dentro de un material de partida, intermediario, o IFAs durante la producción, muestreo, embalaje o re embalaje, almacenamiento o transporte

Contaminación cruzada - Contaminación de un material o producto con otro material o producto

Control de calidad (QC) - Evaluar o testear que se cumplan las especificaciones

Control del proceso - Chequeos realizados durante la producción, a f in de monitorear y, en caso de necesitarlo, ajustar el proceso y/o asegurar que el intermediario o IFAs concuerda con l as especificaciones.

Criterio de aceptación - Limites numéricos, rangos u otras medidas adecuadas para la aceptación de los resultados de testeo.

Crítico - Describe un paso del proceso, la condición del proceso, los requerimientos de testeo u otro parámetro relevante o punto que debe ser controlado, dentro de un criterio predeterminado, para asegurar que el IFAs cumple con la especificación.

Cuarentena - Estado de materiales aislados físicamente o por otros medios efectivos, con decisión pendiente acerca de su aprobación o rechazo subsiguiente.

Departamento de calidad - Una unidad organizacional independiente de la producción, que cumple las responsabilidades de la Garantía de calidad y del Control de calidad. Puede darse en forma separada en unidades de QA y de QC o reunidos en un solo individuo o grupo, dependiendo del tamaño y la estructura de la organización.

Desvío - Alejamiento de una instrucción aprobada o Estándar establecido.

Elaboración - Todas las operaciones de recepción de materiales, producción, envasado, reenvasado, rotulado, re-rotulado, control de calidad, despacho, almacenaje y distribución de los IFAs y sus controles asociados.

Elaborador contratado - Un elaborador que realiza algún aspecto de la fabricación para el elaborador original

Especificación - Una lista de pruebas referidas a los procedimientos analíticos, y de criterios adecuados de aceptación que son límites numéricos, rangos, u otro criterio para el test que se describe. Establece un conjunto de criterios con los cuales el material debe cumplir para ser considerado aceptable para su uso propuesto.

"Conforme a l a especificación" significa que el material, al ser t esteado de acuerdo con los procedimientos analíticos listados, concuerda con los criterios establecidos de aceptación.

Estándar de referencia primario - Sustancia que ha sido probada como material auténtico por un extenso juego de ensayos analíticos, siendo en consecuencia de alta pureza.

Este Estándar puede ser: 1) obtenido de una fuente oficialmente reconocida, 2) preparado por síntesis independiente, 3) obtenido de material de producción de alta calidad, existente, o 4) preparado por purificación adicional de material de producción existente.

Estándar de referencia secundario - Sustancia de calidad y pureza establecidas, demostradas por comparación de un Estándar de referencia primario, utilizada como Estándar de referencia para análisis de laboratorio de rutina.

Fecha de vencimiento - La fecha colocada en el contenedor/etiqueta de un IFA, designando el tiempo durante el cual el IFAs es supuesto que el producto permanecerá dentro de las especificaciones de su vida útil, si es almacenado en las condiciones requeridas, y después de la cual no debería ser usada.

Fecha de re-evaluación - La fecha en la que el material debería ser reexaminado para asegurar que permanece apto para su uso.

Firma (firmado) - Ver definición posterior de firmado

Firmado - El registro del individuo que llevó a cabo una acción particular o revisión. Este registro puede ser con iniciales, firma completa a mano, sello personal, o firma electrónica asegurada y autenticada.

Garantía de calidad (QA) - La suma total de las disposiciones organizadas hechas con el objeto de asegurar que todos los IFAs son de la calidad requerida para el uso que están destinados y que los sistemas de calidad son constantes y mantenidos.

Impureza - Todo componente presente en el

intermediario o IFA, que no sea la entidad deseada.

Intermediario - El material producido durante las etapas del proceso de un IFAs que experimenta cambios moleculares adicionales antes de que se transforme en IFA. Los intermediarios pueden o no estar aislados (Nota: esta guía sólo se refiere a aquellos intermediarios producidos después del punto en que la Compañía ha definido como punto en el que comienza la producción del IFAs)

Líquidos madre - El líquido residual que resta luego de l os procesos de cristalización o aislamiento. Un líquido madre puede contener materiales no reactivos, intermediarios, niveles del IFA y/o impurezas. Puede ser utilizado para un proceso adicional.

Lote - Una cantidad específica de material producido en un proceso o serie de procesos de forma que se espera que sea homogéneo dentro de límites especificados. En el caso de producción continua, un lote puede corresponder a una fracción definida de la producción. El tamaño del lote puede ser definido ya sea por una cantidad fija o por la suma producida en un intervalo fijo de tiempo.

Material - Término general utilizado para denotar materiales de partida (materiales iniciales, reactivos, solventes) auxiliares del proceso, intermediarios, IFAs y materiales de embalaje y etiquetado

Material de embalaje - Todo material destinado a proteger un intermediario o IFAs durante el almacenaje o transporte.

Material de inicio IFA - Una materia prima, intermedia o un IFAs que es utilizada en la producción de otro IFAs y que es incorporada como fragmento estructural significativo dentro de la estructura del IFAs. U n material de inicio IFAs puede ser un artículo comercial, un material comprado a uno o más proveedores bajo contrato o acuerdo marcial, o producido domésticamente. Los materiales de inicio IFAs son definidos normalmente por sus propiedades y estructura química.

Materia prima - Término general utilizado para denotar materiales de inicio, reactivos y solventes destinados a s er utilizados en la producción de intermediarios o de IFAs.

Número de Lote - Una combinación única de números, letras, y/o símbolos que identifica un lote y por el cual puede ser determinado el historial de la producción y distribución.

Perfil de impureza - Una descripción de las impurezas identificadas y no identificadas, presentes en el IFAs .

Procedimiento - Descripción documentada de las operaciones a desarrollar, las precauciones que se deben tomar y las medidas a ap lic ar directa o indirectamente, relacionadas con la manufactura de un intermediario o IFAs

Producción - Todas las operaciones involucradas en la preparación de un IFAs desde la recepción de los materiales a lo largo de todo el proceso y hasta el acondicionamiento.

Producto droga (medicinal) - La fórmula de dosificación ya en el envase final inmediato, destinado al mercado (referencia Q1A)

Protocolo de validación - Un plan escrito mencionando como debe ser conducida la validación y que define el criterio de aceptación.

Por ejemplo, el protocolo para un proceso de manufactura identifica el equipo de procesamiento, los rangos críticos de parámetros de proceso y de operación, características del producto, muestras, datos del test que deben recogerse, numero de corridas de validación, y resultados aceptables del testeo.

Re-elaboración - Someter a un intermediario o IFA que no conforma los Estándares o especificaciones a uno o mas pasos del proceso, difiriendo del proceso de manufactura establecido, para obtener un intermediario o IFAs de calidad aceptable (ej recristalización con diferente solvente).

Rendimiento esperado - La cantidad de material o el porcentaje de rendimiento teóricamente esperado, en una fase apropiada de producción basado en escalas piloto de laboratorio previas, o en datos de fabricación.

Rendimiento teórico - La cantidad que debería ser producida en una fase apropiada de producción, basada en la cantidad de material utilizado, y en la ausencia de toda pérdida o error en la producción actual

Reprocesamiento - Introducción de un intermediario o IFAs, incluso uno que no conforme los Estándares o especificaciones, nuevamente en el proceso y repitiendo un paso de cristalización u otro paso de manipulación química o física (ej: destilación, filtración, cromatografía, molienda) que sean parte del proceso establecido de manufactura.

A la continuación de un paso del proceso

después de que el testeo de control del proceso haya demostrado que la etapa está incompleta, se la considerará parte de un proceso normal, y no un Reprocesamiento.

Sistema informático - Un grupo de componentes de hardware y su software asociado, diseñados y organizados para cumplir una función específica o grupo de funciones.

Solvente - Líquido orgánico o i norgánico utilizado como vehículo para la preparación de soluciones o suspensiones en la manufactura de un intermediario o IFA

Sustancia droga - Ver IFAs(o sustancia droga).

Validación - Programa documentado que suministra un alto grado de seguridad de que un proceso específico, método, o sistema producirán consistentemente un resultado que conformará con un criterio predeterminado de aceptación.

ANEXO 1

ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS ESTÉRILES

PRINCIPIO - La elaboración de medicamentos estériles está sujeta a requisitos especiales para minimizar los riesgos de contaminación microbiana, de partículas y de piretógenos. Depende en gran parte de la habilidad, formación y actitud del personal implicado. La garantía de calidad reviste una importancia especial y esta elaboración debe seguir estrictamente métodos de preparación y procedimientos establecidos y validados cuidadosamente. La esterilidad u otros aspectos de la calidad no debe depender únicamente de un proceso final o de los ensayos sobre producto terminado.

NOTA: esta normativa no establece métodos detallados para la determinación de limpieza microbiológica y de partículas del aire, superficies, entre otras. Con esta finalidad deben consultarse otros documentos como ser las normas ISO.

Consideraciones generales

1 - La elaboración de medicamentos estériles debe realizarse en áreas limpias en las que se acceda a través de esclusas independientes para el personal y/o para equipos y materiales. Las zonas limpias deberán mantenerse con un grado adecuado de limpieza y estarán dotadas de aire que haya pasado a través de filtros de eficacia apropiada.

2 - Las diversas operaciones de preparación de los materiales y accesorios, preparación del producto y llenado deberán realizarse en zonas separadas dentro de la zona limpia. Las operaciones de fabricación se clasifican en dos categorías: en primer lugar, aquellas en que el producto se esteriliza al final y, en segundo lugar, aquellas que se realizan asépticamente en todas o algunas de sus etapas.

3 - Las áreas limpias para la fabricación de medicamentos estériles se clasifican según las características requeridas del ambiente. Cada operación de elaboración exige un adecuado grado de limpieza del entorno en operación para minimizar los riesgos de contaminación microbiana o de partículas en el producto o los materiales que se estén manipulando.

A - fin de cumplir las condiciones “en operación”, estas áreas ~~zonas~~ deben diseñarse de forma que alcancen ciertos niveles especificados de limpieza del aire en situación de “en reposo”. La situación “en reposo” es aquella en que la instalación está completa con su equipo de producción instalado y en funcionamiento pero sin que esté presente el personal. La situación “en operación” es aquella en que la instalación está funcionando de la forma definida de trabajo con el número especificado de personal en actividad.

Las situaciones “en operación” y “en reposo” deben definirse para cada área limpia o zona de áreas limpias.

Para la elaboración de medicamentos estériles pueden distinguirse 4 grados de zonas limpias:

Grado A - La zona específica de operaciones de alto riesgo como por ejemplo, zona de llenado, bandejas de tapones, ampollas y viales abiertos y realización de conexiones asépticas. Estas condiciones se consiguen normalmente en cabina de flujo laminar. Los sistemas de flujo laminar deben proporcionar una velocidad homogénea del aire en un intervalo de 0.36 – 0.54 m/s (valor orientativo) en el punto de trabajo de estas operaciones.

El mantenimiento de la laminaridad debe ser demostrado y validado.

Se puede utilizar un flujo de aire unidireccional y velocidades más bajas en aisladores cerrados y cajas de guantes.

Grado B - Este es el entorno de la estación de trabajo grado A, para la preparación y llenado aséptico.

Grado C y D - áreas limpias para llevar a cabo las etapas menos críticas de la elaboración de productos estériles.

Clasificación de áreas limpias y dispositivos de aire limpio

4 - Las áreas limpias y los dispositivos de aire limpio, deben clasificarse de acuerdo con ISO 14.644-1. La clasificación debe diferenciarse claramente del proceso de monitoreo ambiental operacional. La máxima concentración de partículas ambientales permitidas para cada grado se muestra en la siguiente tabla:

Número máximo permitido de partículas/m^3, igual o superior al tamaño tabulado				
Grado	En reposo		En operación	
	0,5 µm	5,0 µm	0,5 µm	5,0 µm
A	3.520	20	3.520	20
B	3.520	29	352.000	2.900
C	352.000	2.900	3.520.000	29.000
D	3.520.000	29.000	No definido	No definido

5 - Con propósito de clasificación de zonas Grado A, debe tomarse como mínimo un volumen de muestra de 1 m^3 por punto de muestreo. Para Grado A la clasificación de partículas ambientales es ISO 4.8 dictado por el límite de partículas ≥ 5,0 µm. Para el Grado B (en reposo), la clasificación de partículas ambientales es ISO 5 para ambos tamaños de partículas considerados. Para Grado C (en reposo y en operación) la clasificación de partículas ambientales es ISO 7 e ISO 8 respectivamente. Para Grado D (en reposo) la clasificación de partículas ambientales es ISO 8. Con el propósito de clasificación, la norma ISO 14.644-1, define tanto el número mínimo de puntos de muestreo como el tamaño de la muestra basado en el límite de clase del mayor tamaño de partícula considerado y el método de evaluación de los datos recolectados.

6 - Con propósito de clasificación deben utilizarse contadores de partículas portátiles con mangueras de muestreo de corta longitud, debido a la tasa relativamente alta de precipitación de partículas ≥ 5,0 µm en sistemas de muestreo remoto con mangueras de larga longitud. En sistemas de aire unidireccional deben utilizarse sondas de muestreo isocinéticas.

7 - La clasificación “en operación” puede ser demostrada durante operaciones normales, operaciones simuladas o durante la operación de simulación con medio de cultivo (“media fill”), eligiendo para las simulaciones, el “peor caso”. En ISO 14.644-2 se dispone de información sobre ensayos para demostrar cumplimiento continuo con la clasificación de limpieza asignada.

Monitoreo de áreas limpias y dispositivos de aire limpio.

8 - Las áreas limpias y los dispositivos de aire limpio deben ser monitoreados rutinariamente en operación y las posiciones de monitoreo deben basarse en un estudio de análisis de riesgo formal y en los resultados obtenidos durante la clasificación de las áreas y/o dispositivos de aire limpio.

9. - Para las zonas Grado A, el monitoreo de partículas debe llevarse a cabo durante toda la duración del procesamiento crítico, incluyendo ensamblado del equipo, excepto cuando sea justificado por contaminantes en el proceso que podrían dañar el contador de partículas o presentar un peligro, como por ejemplo organismos vivos y peligros radiológicos. En estos casos debe llevarse a cabo el monitoreo durante el inicio de las operaciones de rutina del equipo, previo a la exposición al riesgo. Debe también realizarse monitoreo durante operaciones simuladas. Las zonas Grado A deben monitorearse con una frecuencia y con un tamaño de muestra adecuado, tal que, todas las intervenciones, eventos transitorios y cualquier deterioro del sistema pueda ser capturado y dispararse las alarmas si se exceden los límites de alerta. Es aceptado que no siempre es posible demostrar bajos niveles de partículas ≥ 5,0 µm en el punto de llenado cuando se realiza esta operación, debido a la generación de partículas o gotitas del producto mismo.

10 - Es recomendable que un sistema similar se utilice para zonas de Grado B aunque la frecuencia de muestreo puede disminuirse. La importancia del sistema de monitoreo de partículas debe ser determinada por la efectividad de la segregación entre las zonas adyacentes Grado A y B. La zona Grado B debe monitorearse con una frecuencia y con un tamaño de muestra adecuado, tal que, los cambios en los niveles de contaminación y cualquier deterioro del sistema pueda ser capturado y dispararse las alarmas si se exceden los límites de alerta.

11 - Los sistemas de monitoreo de partículas ambientales pueden consistir en contadores de partículas independientes; una red de puntos de muestreo con acceso secuencial conectados por un conector múltiple (“manifold”) a un contador de

partículas único; o una combinación de ambos. La selección del sistema debe ser apropiado a tamaño de partícula considerado. Cuando se utilizan sistemas de muestreo remotos, el largo de la tubería y el radio de cualquier curva de la misma, debe ser considerado en el contexto de pérdidas de partículas en la tubería. La selección del sistema de monitoreo debe tener en cuenta cualquier riesgo presentado por los materiales utilizados en las operaciones de elaboración, por ejemplo aquellos que involucran organismos vivos o radiofarmacéuticos.

12 - El tamaño de las muestras tomadas con propósito de monitoreo utilizando sistemas automatizados usualmente son función de la velocidad de muestreo del sistema utilizado. No es necesario que el volumen de muestra sea el mismo que el utilizado para la clasificación formal de las áreas limpias y dispositivos de aire limpio.

13 - En zonas de Grado A y B, el monitoreo del conteo de la concentración de partículas $\geq 5{,}0$ µm toma una significancia particular ya que es una herramienta importante de diagnóstico para una temprana detección de falla. La indicación ocasional de conteos de partículas $\geq 5{,}0$ µm puede deberse a falsos conteos debido a ruido electrónico, luz dispersa o errática, coincidencia, etc. No obstante conteos consecutivos o regulares de bajos niveles es un indicador de un evento posible de contaminación y debe ser investigado. Estos eventos pueden indicar una falla temprana del sistema HVAC, falla del equipamiento de llenado o pueden también ser diagnóstico de malas prácticas durante la puesta en marcha de las máquinas y las operaciones de rutina.

14 - Los límites de partículas señalados en la tabla para el estado “en reposo” deben recuperarse después de un breve período “de limpieza” de 15-20 minutos (valor orientativo) en ausencia de personal y una vez finalizadas las operaciones.

15 - El monitoreo de áreas de Grado C y D en operación debe realizarse de acuerdo con los principios de la gestión de riesgos para la calidad. Los requisitos y los límites de alerta/acción dependerán de la naturaleza de las operaciones que se llevan a cabo, pero debe alcanzarse el “período de limpieza” recomendado.

16 - Otras características como la temperatura y la humedad relativa dependen del producto y la naturaleza de las operaciones llevadas a cabo. Estos parámetros no deberán interferir con el estándar definido de limpieza.

17. Se muestran, en la tabla siguiente, ejemplos de operaciones a desarrollarse en los diferentes grados (ver también párrafos 28 a 35):

Grado	Ejemplos de operaciones para productos esterilizados en forma terminal (ver párrafos 28-30)
A	Llenado de productos, cuando inusualmente se encuentren en riesgo
C	Preparación de soluciones, cuando inusualmente se encuentren en riesgo. Llenado de productos.
D	Preparación de soluciones y materiales para el subsiguiente llenado

Grado	Ejemplos de operaciones para preparaciones asépticas (ver párrafos 31-35)
A	Preparación y llenado aséptico
C	Preparación de soluciones a ser filtradas
D	Manejo de los materiales y accesorios después del lavado

18 - Donde se desarrollan operaciones asépticas, el control debe ser frecuente mediante el uso de métodos tales como placas de exposición, muestreo de aire volumétrico y de superficie (por ej. hisopos y placas de contacto). Las zonas no deben contaminarse por los métodos de muestreo utilizados en la operación. Deben tenerse en cuenta los resultados del monitoreo, al revisar la documentación del lote para la liberación del producto terminado. Después de operaciones críticas deben controlarse las superficies y el personal. También se requiere control microbiológico adicional fuera de las operaciones de producción, por ej. después de la validación de sistemas, limpieza y sanitización.

19 - Límites recomendados para el monitoreo microbiológico de las áreas limpias durante las operaciones:

Tabla 2. Límites recomendados para el monitoreo de la contaminación microbiana [(a)]

Grado	Muestra de aire ufc/m^3	Placas de exposición (diámetro 90 mm), ufc/4 horas [(b)]	Placas de contacto (diámetro 55 mm), ufc/placa	Impresión de guante 5 dedos ufc/guante
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

Notas: [(a)] Estos son valores promedio.
[(b)] Pueden exponerse placas de exposición individuales por menos de 4 horas.

20. - Se deben establecer límites de alerta y acción apropiados para los resultados del monitoreo de partículas y microbiológico. Los procedimientos operativos deben indicar la acción correctiva si se exceden estos límites.

Tecnología de aislador

21 - La utilización de la tecnología del aislador para minimizar las intervenciones humanas en las áreas de procesamiento, puede dar como resultado una reducción significativa en el riesgo de contaminación microbiológica, procedente del ambiente para los productos elaborados asépticamente. Existen numerosos diseños posibles de aisladores y dispositivos de transferencia. El aislador y el entorno deben diseñarse de manera que posibiliten la calidad del aire requerida para las respectivas zonas. Los aisladores se construyen de diferentes materiales más o menos propensos a las pinchaduras y las fugas. Los diseños de los dispositivos de transferencia pueden variar desde una puerta simple o una puerta doble, a sistemas completamente sellados con mecanismos de esterilización incorporados.

22 - La transferencia de materiales dentro y fuera de las unidades constituye una de las mayores potenciales fuentes de contaminación. Por lo general, el área dentro del aislador es el lugar donde se hacen las manipulaciones de alto riesgo, aunque es reconocido que puede no existir flujo de aire laminar en la zona de trabajo de estos equipos.

23 - La clasificación de aire requerida para el entorno depende del diseño del aislador y de su aplicación. Debe controlarse y para el procesamiento aséptico ser, al menos, grado D.

24 - Los aisladores deben utilizarse solamente después de una validación adecuada. La validación debe considerar todos los factores críticos de la tecnología de aislador, por ejemplo, la calidad del aire dentro y fuera del aislador (entorno), la sanitización del aislador, el proceso de transferencia y la integridad del aislador.

25 - Debe realizarse un monitoreo rutinario y se deben incluir ensayos de fuga del aislador y del sistema guante/manga.

Tecnología de soplado/llenado/sellado

26 - Las unidades de soplado/llenado/sellado son máquinas diseñadas específicamente, para que en una operación continua, se formen los envases a partir de un granulado termoplástico, se llenan y se sellan todo en una sola máquina automática. El equipo de soplado/llenado/sellado utilizado para la producción aséptica, que esté provisto de un chorro eficaz de aire de grado A, puede instalarse en un entorno al menos de grado C, siempre que se utilice vestimenta de grado A/B.

El entorno debe cumplir con los límites microbiológicos y de partículas no viables “en reposo” y sólo con el límite microbiológico “en operación”. El equipo de soplado/llenado/sellado utilizado para la elaboración de productos con esterilización terminal, debe instalarse en un entorno de, al menos, grado D.

27 - Debido a esta tecnología, se debe prestar especial atención a, los siguientes puntos:

- diseño y calificación del equipamiento,
- validación y reproducibilidad de la limpieza *in situ* y la esterilización *in situ*
- La clasificación del entorno de la sala limpia en la que se encuentra el equipo
- la capacitación y vestimenta del operador
- intervenciones en la zona crítica del equipo incluyendo cualquier ensamblaje aséptico antes del comienzo de la operación de llenado.

Productos esterilizados en forma terminal

28 - La preparación de los materiales, accesorios y de la mayoría de los productos debe hacerse al menos en un entorno de grado D para que sea adecuadamente bajo el riesgo de contaminación microbiana y de partículas, para la filtración y esterilización. Cuando el producto tenga un riesgo elevado o inusual de contaminación microbiana (por ejemplo, porque el producto favorezca activamente el crecimiento microbiano o deba pasar mucho tiempo antes de la esterilización o sea preciso elaborarlo necesariamente en recipientes no cerrados), la preparación debe realizarse en un ambiente de grado C.

29 - El llenado de productos con esterilización terminal debe realizarse en un ambiente al menos de grado C.

30 - El llenado debe hacerse en una estación de trabajo grado A con un entorno al menos de grado C, cuando para el producto exista un riesgo inusual de contaminación ambiental, por ejemplo debido a que la operación de llenado sea lenta o los recipientes tengan boca ancha o estén expuestos necesariamente durante más de unos segundos antes de su cierre. La preparación y llenado de pomadas, cremas, suspensiones y emulsiones debe realizarse generalmente en un ambiente de grado C antes de la esterilización final.

Preparación aséptica

31 - Después de su lavado, los materiales de envasado deben manipularse en un ambiente de al menos grado D. El manipuleo de materias primas y materiales estériles, a menos que se los someta a esterilización o filtración a través de un filtro que retenga microorganismos, en una etapa posterior del proceso, debe tener lugar en una estación de trabajo grado A con un entorno grado B.

32 - La preparación de soluciones que deban esterilizarse por filtración durante el proceso debe hacerse en un ambiente de grado C; si no se filtran, la preparación de materiales y productos debe hacerse en una estación de trabajo grado A con un entorno grado B.

33 - La manipulación y el llenado de productos preparados asépticamente deben hacerse en una estación de trabajo grado A con un entorno grado B.

34 - La transferencia de recipientes parcialmente tapados, como los utilizados en la liofilización, antes de completar su cerrado, debe hacerse en una zona de grado A con entorno de grado B o bien en bandejas de transporte cerradas en un ambiente de grado B.

35 - La preparación y llenado de pomadas, cremas, suspensiones y emulsiones estériles deben hacerse en una estación de trabajo grado A con entorno de grado B, cuando el producto esté expuesto y no se filtre posteriormente.

Personal

36 - Sólo el mínimo número de personal necesario debe encontrarse presente en las áreas limpias: esto es particularmente importante durante los procesamientos asépticos. En la medida de lo posible, las inspecciones y los controles deben realizarse fuera de las áreas limpias.

37 - Todo el personal empleado en estas zonas (incluido el de limpieza y mantenimiento) debe recibir formación regular en disciplinas relativas a la correcta elaboración de productos estériles. Esta formación debe hacer referencia a la higiene y a los elementos básicos de microbiología. Cuando sea necesario el acceso de personal externo que no haya recibido dicha formación (por ejemplo, personal contratado de construcción o mantenimiento), se le prestará especial atención a su formación y supervisión.

38 - El personal que haya intervenido en la elaboración de materiales de tejidos animales o de cultivos de microorganismos distintos de los utilizados en el proceso de fabricación en curso, no deberá penetrar en las zonas de producción estéril salvo que hayan seguido procedimientos de entrada rigurosos y claramente definidos.

39 - Es fundamental conseguir altos niveles de higiene personal y limpieza. El personal de elaboración de productos estériles debe recibir instrucciones para que comunique cualquier situación que pueda causar la liberación de cantidades o tipos anormales de contaminantes; es deseable realizar chequeos sanitarios periódicos para detectar tales situaciones. Las medidas que deban tomarse respecto al personal que pueda suponer un riesgo microbiológico indebido deberán ser decididas por una persona competente designada a tal efecto.

40 - En las áreas limpias no se deben usar relojes de pulsera, maquillaje ni joyas.

41 - El cambio y el lavado de ropa se deben ajustar a un procedimiento escrito para minimizar la contaminación de la vestimenta de la zona limpia o la introducción de contaminantes en dicha zona.

42 - La vestimenta y su calidad deben ser adecuadas al proceso y al grado de la zona de trabajo. Se debe llevar de forma que proteja al producto de la contaminación.

43 - A continuación se describe la vestimenta necesaria para cada grado:

- *Grado D* - Se debe cubrir el cabello y, de corresponder la barba. Se debe usar un traje protector general y calzado o cubre calzado adecuados. Se deben tomar medidas para evitar la entrada en la zona limpia de contaminación procedente del exterior.
- *Grado C* - Se debe cubrir el cabello y, de corresponder, la barba y el bigote. Se debe usar un traje entero o de dos piezas, ceñido en las muñecas y de cuello alto, junto con calzado o cubre calzado adecuados. Esta ropa no debe liberar prácticamente ninguna fibra ni partícula.
- *Grado A/B* - El cabello y, de corresponder, la barba y el bigote se deben cubrir con una escafandra que se introducirá en el cuello del traje; se debe utilizar una máscara facial para evitar la emisión de gotitas. Se deben utilizar guantes apropiados esterilizados de goma o plástico, sin polvos de talco, y se debe llevar calzado esterilizado o desinfectado. La parte inferior de los pantalones se debe introducir en el calzado y las mangas en los guantes. La vestimenta protectora no debe liberar prácticamente ninguna fibra ni partícula y debe retener las partículas producidas por el cuerpo.

44 - La vestimenta de exterior no se debe introducir en los vestuarios que llevan a las salas de grado B y C. Cada trabajador de las áreas de grado A/B debe recibir su vestimenta protectora limpia y esterilizada, en cada sesión de trabajo. Los guantes se deben desinfectar periódicamente durante las operaciones. Las máscaras y los guantes se deben cambiar al menos en cada sesión de trabajo.

45 - La vestimenta de las áreas limpias se debe lavar y tratar de forma que no acumule contaminantes adicionales que pueda liberar posteriormente. Estas operaciones se deben ajustar a procedimientos escritos. Es recomendable disponer de instalaciones de lavandería independientes para esta vestimenta. El tratamiento inadecuado de la vestimenta deteriora las fibras y puede aumentar el riesgo de liberación de partículas.

Locales

46 - En las zonas limpias, todas las superficies expuestas deben ser lisas, impermeables y sin fisuras, con el fin de minimizar la liberación o acumulación de partículas o microorganismos y permitir la aplicación repetida de agentes de limpieza, y desinfectantes.

47 - No debe haber recovecos difíciles de limpiar y debe haber un número mínimo de repisas, estantes, armarios y equipo, para reducir la acumulación de polvo y facilitar la limpieza. Las puertas deben diseñarse cuidadosamente para evitar los citados recovecos difíciles de limpiar, por esta razón no son recomendables las puertas corredizas.

48 - Los techos falsos deben quedar sellados para evitar la contaminación procedente del espacio situado por encima de los mismos.

49 - Las tuberías y conductos, como así también otros servicios, deben instalarse de manera que no presenten huecos ni aperturas sin sellar, ni superficies difíciles de limpiar.

50 - No deben existir sumideros y desagües en las áreas de grado A/B utilizadas en la producción aséptica. En otras áreas, se deben colocar sifones entre la máquina o el sumidero y los desagües. Los desagües del suelo de las salas de menor grado de limpieza deben estar provistos de trampas o tapas herméticas para evitar el reflujo.

51 - Los vestuarios estarán diseñados como esclusas y se utilizarán para proporcionar una separación física de las diferentes fases de cambio de ropa, para minimizar así la contaminación microbiana y por partículas de la vestimenta protectora. Los vestuarios estarán barridos de forma eficaz por aire filtrado. La fase final del vestuario deberá tener, en situación de reposo, el mismo grado que la zona a la que conduzca. A veces es recomendable utilizar vestuarios separados para la entrada y la salida de las zonas limpias. En general, sólo habrá lavabos en la primera fase de los vestuarios.

52 - Las puertas de una esclusa no se abrirán simultáneamente. Se debe disponer de un sistema de cierre interbloqueado o de un sistema de alarma visual y/o auditiva, a fin de evitar la apertura de más de una puerta a la vez.

53 - La entrada de aire filtrado debe mantener una presión positiva y un flujo de aire respecto a las zonas adyacentes de grado menor en todas las

condiciones de trabajo y debe barrer eficazmente la zona. Las salas adyacentes de diferentes grados deben tener un gradiente de presión de 10-15 pascales (valores orientativos). Debe prestarse especial atención a la protección de la zona de mayor riesgo, es decir, el entorno inmediato al que están expuestos el producto y los materiales y accesorios limpios que entren en contacto con el producto. Las diferentes consideraciones relacionadas con la entrada de aire y los diferenciales de presión pueden necesitar ser modificadas en el caso que sea necesario contener ciertos materiales, por ejemplo materiales o productos patogénicos, altamente tóxicos, radioactivos o de virus o bacterias vivos. Para algunas operaciones puede ser necesaria la descontaminación de las instalaciones y el tratamiento del aire que sale del área limpia.

54 - Debe demostrarse que los patrones de flujo de aire no presentan ningún riesgo de contaminación, por ejemplo se debe comprobar que los flujos de aire no distribuyen partículas generadas por personas, operaciones o máquinas a una zona de mayor riesgo para el producto.

55 - Se debe contar con un sistema de alerta que indique fallos en el suministro de aire. Se deben instalar indicadores de diferencial de presión entre áreas donde estas diferencias son importantes. Dichas diferencias de presión deben registrarse regularmente o, en su defecto, documentarse.

Equipamiento

56 - Las cintas transportadoras no deben pasar nunca a través de la separación entre una zona de grado A o B y una zona de elaboración de menor grado de limpieza de aire, salvo que la propia cinta sea esterilizada continuamente (por ejemplo, en un túnel de esterilización).

57 - En la medida de lo posible, los equipos, accesorios y servicios se deben diseñar e instalar, de forma que las operaciones, el mantenimiento y las reparaciones se puedan realizar fuera del área limpia. Si es necesaria una esterilización, se debe llevar a cabo, siempre que sea posible, después de montar por completo todo el equipo.

58 - Cuando se hayan realizado operaciones de mantenimiento del equipo dentro del área limpia, el área se debe limpiar, sanitizar y/o esterilizar, de corresponder, antes de volver a iniciar el proceso, si no se han mantenido durante el trabajo los niveles exigidos de limpieza o asepsia.

59 - Las instalaciones de tratamiento y los sistemas de distribución de agua se deben diseñar, construir y mantener de forma que se asegure la producción confiable de agua de calidad apropiada. Estas instalaciones no deben ser operadas por encima de su capacidad de diseño. El agua para inyectables se debe producir, almacenar y distribuir de manera que se evite el desarrollo microbiano, como por ejemplo, mediante circulación constante a una temperatura superior a los 70°C.

60 - Todo el equipo, como esterilizadores, sistemas de filtración y tratamiento de aire, suministro de aire y filtros de gas, sistemas de tratamiento, generación, almacenamiento y distribución de agua, deben ser sometidos a un plan de mantenimiento y validación; se debe aprobar su uso después de haberse realizado el mantenimiento.

Sanitización

61 - La sanitización de áreas limpias es de vital importancia. Deben limpiarse exhaustivamente de acuerdo con un programa escrito. Donde se utilizan desinfectantes, se debe utilizar más de un tipo. Se deben realizar controles periódicos para detectar la aparición de cepas resistentes.

62 - Se deben controlar los desinfectantes y detergentes para detectar contaminación microbiana; las diluciones se deben conservar en envases previamente limpiados y sólo se las debe almacenar durante períodos definidos, a menos que se las esterilice. Los desinfectantes y detergentes de las áreas de grado A y B deben esterilizarse antes de su uso.

63 - La fumigación en áreas limpias puede ser útil para reducir la contaminación microbiológica de lugares inaccesibles.

Procesamiento

64 - Deben tomarse las precauciones tendientes a minimizar contaminación durante todas las etapas del procesamiento, inclusive las etapas previas a la esterilización.

65 - Las preparaciones de origen microbiológico no deben elaborarse ni llenarse en áreas utilizadas para el procesamiento de otros productos farmacéuticos; sin embargo, las vacunas de microorganismos muertos o de extractos bacterianos pueden envasarse, previa inactivación, en los mismos locales que otros productos farmacéuticos estériles.

66 - La validación del proceso aséptico debe incluir una simulación del proceso utilizando un medio de cultivo (“Media fill”). La selección del medio de cultivo debe basarse en la forma farmacéutica del producto y en la selectividad,

claridad, concentración y aptitud para la esterilización del medio de cultivo.

67 - La simulación del proceso debe imitar, lo más fielmente posible, el proceso de elaboración aséptico de rutina e incluir todos los pasos críticos posteriores de la elaboración. Asimismo, se debe tener en cuenta diferentes intervenciones que se sabe pueden tener lugar durante la producción normal, como así también las situaciones de peor caso.

68 - Los ensayos de simulación deben realizarse como una validación inicial, con tres ensayos de simulación satisfactorios consecutivos por turno de trabajo y ser repetidos a intervalos definidos y posteriores a cualquier modificación significativa del sistema HVAC, del equipamiento, del proceso o del número de turnos de trabajo. Por lo general, los ensayos de simulación de procesos deben repetirse dos veces al año por turno de trabajo y por proceso.

69 - La cantidad de envases utilizados para llenado con el medio de cultivo debe ser suficiente para que la evaluación sea válida. Para lotes pequeños, el número de envases para el medio de cultivo debe, ser al menos igual al tamaño del lote del producto. El objetivo debe ser crecimiento cero y debe aplicarse lo siguiente:

a) Cuando se llenan menos de 5.000 unidades, no se deben detectar unidades contaminadas.

b) Cuando se llenan de 5.000 a 10.000 unidades:

I. Una (1) unidad contaminada dará lugar a una investigación, incluyendo la consideración de repetir el ensayo simulado;

II. Dos (2) unidades contaminadas se consideran causa para revalidación, posterior a una investigación.

c) Cuando se llenan más de 10.000 unidades:

I. Una (1) unidad contaminada dará lugar a una investigación,

II. Dos (2) unidades contaminadas se consideran causa para revalidación, posterior a una investigación;

70 - Para cualquier tamaño de corrida, incidentes intermitentes de contaminación microbiana pueden ser indicativos de bajos niveles de contaminación que deben ser investigados. La investigación de fallas groseras debe incluir el impacto potencial en el aseguramiento de la esterilidad de lotes elaborados desde la última simulación del proceso exitosa.

71 - Se debe tener la precaución de que ninguna validación presente un riesgo para los procesos.

72 - Deben controlarse regularmente las fuentes de agua, el equipo de tratamiento de agua y el agua tratada, para detectar contaminación química y biológica y, según corresponda, de endotoxinas. Se deben conservar registros de los resultados de los controles y de cualquier acción tomada al respecto.

73 - Las actividades en áreas limpias y, específicamente, cuando existen operaciones asépticas en curso, deben ser mínimas y el movimiento de personal debe ser controlado y metódico, a fin de evitar el desprendimiento excesivo de partículas y microorganismos originado por una actividad demasiado intensa. Debido al tipo de vestimenta usada, la temperatura ambiente y la humedad no deben ser demasiado elevadas.

74 - La contaminación microbiológica de la materia prima debe ser mínima. Las especificaciones deben incluir los requerimientos de calidad microbiológica cuando la necesidad de esto se haya evidenciado mediante el control de las mismas.

75 - En las áreas limpias, se debe minimizar el uso de envases y materiales propensos a generar fibras.

76 - Se deben adoptar medidas tendientes a minimizar la contaminación por partículas del producto final, cuando corresponda.

77 - Después del proceso de limpieza final, los envases, accesorios, y equipos deben manipularse de manera que no se vuelvan a contaminar.

78 - El intervalo entre el lavado y secado y la esterilización de los envases, accesorios y equipos, así como entre su esterilización y su utilización, deberá ser lo más breve posible y estará sometido a un límite de tiempo adecuado a las condiciones de almacenamiento.

79 - El tiempo que pase entre el inicio de la preparación de una solución y su esterilización o filtración a través de un filtro de retención microbiana, debe ser lo más breve posible. Debe existir un tiempo máximo permitido establecido para cada producto, teniendo en cuenta su composición y el método de almacenamiento previsto.

80 - La carga biológica debe controlarse antes de la esterilización. Deben existir límites de trabajo

a los que puede llegar la contaminación inmediatamente antes de la esterilización que están relacionados con la eficacia del método utilizado. Cuando corresponda, se debe controlar la ausencia de piretógenos. El ensayo de carga microbiana debe realizarse en cada lote, tanto para productos con llenado aséptico, como para productos esterilizados terminalmente. Cuando se han establecidos parámetros de esterilización de sobremuerte térmica ("overkill") en productos esterilizados terminalmente, la carga biológica puede ser monitoreada solamente a intervalos regulares adecuados. Para sistemas de liberación paramétrica, el ensayo de carga biológica, debe realizarse en cada lote y debe ser considerado como un ensayo en proceso. Cuando sea pertinente, se debe controlar el nivel de piretógenos. Todas las soluciones, en particular los líquidos de gran volumen para perfusión, deben pasar a través de un filtro de retención microbiana, de ser posible inmediatamente antes del llenado.

81 - Los envases, accesorios, equipos y cualquier otro artículo necesario en un área limpia donde se realizan operaciones asépticas deben esterilizarse e introducirse al área mediante equipos de esterilización de doble puerta embutidos en la pared, o mediante un procedimiento que logre el mismo objetivo de no introducir contaminación. Los gases no combustibles deben pasar a través de filtros de retención microbiana**.**

82 - Se debe validar la eficacia de cualquier procedimiento nuevo y la validación se debe repetir a intervalos programados en función de los resultados históricos o cuando se realice algún cambio significativo en el proceso o en el equipo.

Esterilización

83 - Se deben validar todos los procesos de esterilización. Se debe prestar especial atención cuando el método de esterilización adoptado no se encuentra descripto en la edición vigente de la Farmacopea Argentina o cuando se utiliza para un producto que no es una simple solución acuosa u oleosa. Siempre que sea posible, la esterilización térmica debe ser el método de elección. En todos los casos el proceso de esterilización debe corresponderse con la habilitación de elaboración y la Autorización de Comercialización.

84 - Antes de que se adopte un proceso de esterilización, deberá demostrarse su idoneidad para el producto y su eficacia para lograr las condiciones deseadas de esterilización en todas las partes de cada tipo de carga que deba someterse a dicho proceso, mediante mediciones físicas e indicadores biológicos cuando sea pertinente. Se debe verificar la validez del proceso a intervalos programados, al menos una vez por año y ante cualquier modificación significativa efectuada al equipo. Se deben conservar registros de los resultados.

85 - Para lograr una esterilización eficaz, todo el material debe ser sometido al tratamiento necesario y el proceso debe diseñarse para garantizar que se consigue este objetivo.

86 - Se deben establecer patrones validados de carga para todos los procesos de esterilización.

87 - Los indicadores biológicos deben considerarse como un método adicional de control de la esterilización. Se los debe almacenar y utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se debe comprobar su calidad mediante controles positivos. En caso de que se utilicen indicadores biológicos, deben adoptarse precauciones estrictas para evitar la transferencia de contaminación microbiana a partir de los mismos.

88 - Se debe contar con un medio inequívoco de distinguir los productos que han sido esterilizados de los que no lo han sido. Cada canasta, bandeja o elemento transportador de productos o materiales debe estar rotulado con el nombre del material, el número de lote y la indicación de si fue esterilizado o no. Pueden utilizarse indicadores como la cinta de autoclave, cuando corresponda, para indicar si un lote (o sublote) ha sido sometido o no a un proceso de esterilización, sin embargo, estos indicadores no aseguran de forma fiable que el lote sea estéril en realidad.

89. Deben estar disponibles los registros de esterilización para cada ciclo de esterilización. Deben ser aprobados como parte del procedimiento de liberación de lote.

Esterilización térmica

90 - Cada ciclo de esterilización por calor debe registrarse en un gráfico de tiempo/temperatura con una escala suficientemente amplia o mediante otro equipo adecuado que disponga de la precisión y exactitud necesarias. La posición de las sondas utilizadas para controlar y/o registrar estos datos, se deben haber fijado durante la validación y, de corresponder, haber sido también comprobado con una segunda sonda de temperatura independiente situada en la misma posición.

91 - También pueden utilizarse indicadores químicos o biológicos, pero estos no deben reemplazar las mediciones físicas.

92 - Se debe dejar tiempo suficiente para que toda la carga alcance la temperatura necesaria antes de que comience la medición del tiempo de esterilización. Dicho tiempo debe determinarse para cada tipo de carga a ser procesada.

93 - Después de la fase de temperatura elevada de un ciclo de esterilización térmica, se deben tomar recaudos para evitar que una carga esterilizada se contamine durante su enfriamiento. Cualquier líquido o gas de refrigeración en contacto con el producto debe estar esterilizado, salvo que pueda demostrarse que no se aprobaría el uso de ningún envase que pudiera tener fugas.

Calor húmedo

94 - La temperatura y la presión se deben utilizar para monitorear el proceso. Los instrumentos para ajustar las condiciones serán normalmente independientes de los instrumentos de control y de los gráficos de registro. Cuando se utilicen sistemas automáticos de ajuste y control para estas aplicaciones, deben estar validados para garantizar el cumplimiento de los requisitos críticos del proceso. Las fallas del sistema y del ciclo deben ser registradas por el sistema automatizado y ser observadas por un operador. La lectura del indicador de temperatura independiente, se debe comparar sistemáticamente frente al registro gráfico durante el periodo de esterilización.

Si se trata de esterilizadores que tienen un drenaje en el fondo de la cámara, puede ser necesario también registrar la temperatura en esta posición, durante todo el período de esterilización. Cuando una fase de vacío sea parte del ciclo, deben realizarse regularmente pruebas de ausencia de fugas en la cámara.

95 - Los elementos a esterilizar que no estén en envases cerrados, deben envolverse en un material que permita la eliminación del aire y la penetración del vapor, pero que a su vez, evite la recontaminación después de la esterilización. Todas las partes de la carga deben tomar contacto con el agente esterilizador a la temperatura necesaria durante el tiempo necesario.

96 - Se deben tomar medidas para garantizar que el vapor utilizado para la esterilización es de la calidad adecuada y que no contiene aditivos en un grado que pueda provocar la contaminación del producto o del equipo.

Calor seco

97 - El proceso utilizado debe incluir la circulación de aire dentro de la cámara y el mantenimiento de una presión positiva para evitar el ingreso de aire no estéril. Cualquier aire que ingrese debe hacerlo a través de un filtro HEPA. Cuando este proceso tenga también el objetivo de eliminar piretógenos, se deben utilizar pruebas de desafío con endotoxinas como parte de la validación.

Esterilización por radiación

98 - La esterilización por radiación se utiliza principalmente para la esterilizar materiales y productos sensibles al calor. Numerosos productos farmacéuticos y materiales de empaque son sensibles a la radiación, por lo que este método se permite sólo cuando se ha confirmado experimentalmente la ausencia de efectos nocivos sobre el producto. La irradiación ultravioleta no constituye normalmente un método aceptable de esterilización.

99 - Durante el procedimiento de esterilización debe medirse la dosis de radiación. Con este fin, se deben utilizar indicadores dosimétricos, independientes de la tasa de dosis, que den una medida cuantitativa de la dosis recibida por el propio producto. Los dosímetros se incluirán en la carga en número suficiente y lo bastante próximos para garantizar que siempre haya un dosímetro en el irradiador. Cuando se utilicen dosímetros de plástico, no debe excederse el periodo de validez fijado en su calibración. Las absorbancias de los dosímetros se deben leer en un corto periodo de tiempo después de su exposición a la radiación.

100 - Como control adicional, pueden utilizarse indicadores biológicos.

101 - Los procedimientos de validación deben asegurar que se tienen en cuenta los efectos de las variaciones en la densidad de los envases.

102 - Los procedimientos de manipulación de materiales deben evitar la confusión entre materiales irradiados y no irradiados. Cada paquete debe llevar discos de color sensibles a la radiación para distinguir entre envases que se han sometido a la radiación y los que no.

103 - La dosis de radiación total debe administrarse durante de un periodo de tiempo determinado previamente.

Esterilización con óxido de etileno

104 - Este método sólo debe utilizarse cuando ningún otro método es aplicable. Durante el proceso de validación, debe demostrarse que no produce ningún efecto nocivo sobre el producto y que las condiciones y el tiempo permitidos para la liberación del gas son suficientes para reducir

cualquier gas residual y los productos de reacción hasta límites aceptables definidos según el tipo de producto o material.

105 - Es fundamental el contacto directo entre el gas y las células microbianas; se deben tomar recaudos especiales para evitar la presencia de organismos puedan estar encerrados en materiales como cristales o proteínas desecadas. La naturaleza y la cantidad de los materiales de empaque pueden afectar al proceso de forma significativa.

106 - Antes de la exposición al gas, la humedad y la temperatura de los materiales deben equilibrarse con los valores de las mismas requeridos por el proceso. El tiempo necesario para ello se debe ajustar teniendo en cuenta la necesidad de reducir el tiempo previo a la esterilización.

107 - Cada ciclo de esterilización debe monitorearse con indicadores biológicos apropiados, empleando el número adecuado de unidades de indicadores distribuidas por toda la carga. La información obtenida debe formar parte del registro del lote.

108 - Para cada ciclo de esterilización, se deben llevar registros del tiempo empleado en completar el ciclo, de la presión, temperatura y humedad dentro de la cámara durante el proceso y de la concentración del gas, así como de la cantidad de gas utilizada. Deben existir registros gráficos de la presión y la temperatura durante todo el ciclo. El registro o registros deberán incluirse en la documentación del lote.

109 - Después de la esterilización, la carga se debe almacenar de forma controlada en condiciones de ventilación que permitan que el gas residual y los productos de reacción disminuyan hasta los niveles definidos. Este proceso debe ser validado.

Filtración de productos que no pueden esterilizarse en su envase final.

110 - La sola filtración no se considera suficiente cuando es posible la esterilización en el envase final. De los métodos disponibles en la actualidad, se prefiere la esterilización por vapor. Si el producto no se puede esterilizar en su envase final, los líquidos o soluciones se pueden filtrar, a través de un filtro estéril de 0,22 micrones (o menos) de poro nominal o con propiedades al menos equivalentes de retención de microorganismos, pasando el producto a un recipiente previamente esterilizado. Dichos filtros pueden eliminar la mayor parte de bacterias y hongos, pero no todos los virus ni micoplasmas. Se debe considerar el complementar el proceso de filtración con alguna forma de tratamiento térmico.

111 - Debido a los potenciales riesgos adicionales del método de filtración en comparación con los otros procesos de esterilización, es aconsejable realizar una segunda filtración mediante otro filtro esterilizado que retenga microorganismos, inmediatamente antes del llenado. La última filtración estéril debe llevarse a cabo lo más cerca posible del punto de llenado.

112 - Las características de liberación de fibras de los filtros deben ser mínimas.

113 - Se debe revisar la integridad del filtro esterilizado antes de su uso y se debe confirmar inmediatamente después de su uso, mediante un método adecuado como la prueba de punto de burbuja, flujo difusivo o mantenimiento de la presión. El tiempo empleado para filtrar un volumen conocido de solución a granel y la diferencia de presión que debe aplicarse en el filtro se deben determinar durante la validación y se debe registrar e investigar cualquier diferencia significativa que se dé en estos parámetros durante la elaboración de rutina. Los resultados de estas verificaciones se deben incluir en los registros del lote. Después de cada uso se debe confirmar la integridad de los filtros críticos de las salidas de gas y de aire. La integridad de otros filtros se debe confirmarse a intervalos apropiados.

114 - No se debe utilizar el mismo filtro durante más de una jornada de trabajo a menos que dicho uso se haya validado.

115 - El filtro no debe afectar al producto reteniendo alguno de sus ingredientes o por liberación de sustancias dentro de él.

Acabado de productos estériles

116 - Los viales de liofilización parcialmente tapados, deben mantenerse en todo momento bajo condiciones Grado A hasta que los tapones sean completamente insertados.

117 - Los envases deben ser cerrados mediante métodos debidamente validados. Los envases cerrados por fusión, por ejemplo ampollas de vidrio o plástico deben someterse a una prueba de integridad del 100%. Los otros envases se deben muestrear según procedimientos operativos normalizados para la prueba de integridad.

118 - El sistema de cierre de envase de los viales llenados asépticamente no está totalmente asegurado hasta que el precinto de aluminio haya sido engrapado en su lugar sobre el vial con tapón.

El engrapado del precinto debe realizarse tan pronto como sea posible, después que se haya insertado el tapón.

119 - Como el equipo utilizado para engrapar los precintos de los viales puede generar grandes cantidades de partículas no viables, el equipo debe ubicarse como una estación separada equipada con una extracción de aire adecuada.

120 - El engrapado de viales puede llevarse a cabo como un proceso aséptico utilizando precintos esterilizados o como un proceso limpio fuera del núcleo aséptico. Cuando se adopta esta última opción, los viales deben protegerse bajo condiciones Grado A hasta el punto de dejar el área de procesamiento aséptico, y a partir de entonces los viales con tapón deben protegerse con una provisión de aire Grado A hasta que el precinto haya sido engrapado.

121 - Los viales con tapones perdidos o desplazados, deben ser rechazados previo al engrapado. Cuando se requiere la intervención humana en la estación de engrapado debe utilizarse tecnología adecuada para prevenir el contacto directo con los viales y para minimizar la contaminación microbiana.

122 - Barreras de acceso restringido y aisladores, pueden ser beneficiosos en el aseguramiento de las condiciones requeridas y para minimizar las intervenciones humanas directas dentro de la operación de engrapado.

123 - En los envases cerrados al vacío se comprobará el mantenimiento de este vacío tras un periodo adecuado y previamente determinado.

124 - Los envases de productos parenterales llenos deben inspeccionarse individualmente, a fin de detectar contaminación por materia extraña u otros defectos. Si la inspección se hace visualmente, deberá llevarse a cabo en condiciones adecuadas y controladas de iluminación y fondo. Los operarios que realicen la inspección deben someterse a controles periódicos de agudeza visual, con anteojos, de necesitarlos y se les deben permitir descansos frecuentes durante la jornada de trabajo. Cuando se utilicen otros métodos de inspección, se debe validar el proceso y el funcionamiento del equipo se debe controlar a intervalos preestablecidos. Los resultados deben quedar registrados.

Control de calidad

125 - El ensayo de esterilidad aplicado al producto terminado deberá considerarse sólo como el último elemento de una serie de medidas de control mediante las que se asegura la esterilidad. El ensayo debe validarse respecto al producto correspondiente.

126 - En aquellos casos en los que se ha autorizado la liberación paramétrica, se debe prestar especial atención a la validación y el monitoreo del proceso de elaboración en su totalidad.

127 - Las muestras que se toman para el ensayo de esterilidad deben ser representativas de todo el lote, deben incluir muestras tomadas de partes del lote consideradas en mayor riesgo de contaminación. Por ejemplo:

a) Para productos llenados asépticamente, las muestras deben incluir envases llenados al comienzo y al final del lote y después de cualquier intervención significativa;
b) Para productos esterilizados térmicamente en su envase final, se debe considerar tomar muestras procedentes de la parte potencialmente más fría de la carga.

ANEXO 2

ELABORACION DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS BIOLÓGICOS DE USO HUMANO

ALCANCE

Los métodos empleados en la elaboración de productos farmacéuticos biológicos constituyen un factor crítico para el diseño de un control regulatorio apropiado. Por lo tanto, en rasgos generales, los productos farmacéuticos biológicos pueden definirse según su método de elaboración. Los productos farmacéuticos biológicos preparados por los siguientes métodos de elaboración serán comprendidos por el alcance de este anexo[1].

NOTA: [1] Los productos medicinales biológicos elaborados por estos métodos incluyen: vacunas, inmunosueros, antígenos, hormonas, citoquinas, enzimas y otros productos de fermentación (incluyendo anticuerpos monoclonales y productos derivados del r-DNA).

a) Cultivos microbiológicos, excepto los que resultaren de técnicas de ADN-r.

b) Cultivos microbiológicos y celulares, incluyendo los resultantes de ADN recombinante o técnicas de hibridoma.

c) Extracción de tejidos biológicos.

d) Propagación de agentes vivos en embriones o animales.

(No todos los principios de esta norma deben aplicarse necesariamente a los productos de categoría a).

NOTA: al redactar esta norma, se proporcionó adecuada consideración a los requisitos generales de establecimientos elaboradores y laboratorios de control propuestos por la OMS.

La presente norma no establece requisitos detallados para clases específicas de productos biológicos.

PRINCIPIO - La elaboración de productos farmacéuticos biológicos implica ciertas consideraciones específicas que surgen de la naturaleza de los productos y procesos. La forma en que se elaboran, controlan y administran los productos farmacéuticos biológicos requieren ciertas medidas de precaución.

A diferencia de los productos farmacéuticos convencionales, que se producen utilizando técnicas químicas y físicas con un alto nivel de consistencia, la elaboración de productos farmacéuticos biológicos requiere procesos y materiales biológicos, tales como el cultivo de células o la extracción de material de organismos vivos. Estos procesos biológicos pueden mostrar una variabilidad inherente, de modo que la gama y la naturaleza de los subproductos son variables. Además, los materiales utilizados en dichos procesos de cultivo proporcionan buenos sustratos para el desarrollo de contaminantes microbianos.

El control de los productos farmacéuticos biológicos requiere, por lo general, técnicas analíticas biológicas de mayor variabilidad que las determinaciones físico-químicas. Por lo tanto, los controles en proceso tienen gran importancia en la elaboración de productos farmacéuticos biológicos.

Las propiedades especiales de los productos farmacéuticos biológicos exigen una cuidadosa consideración en cualquier código de Buena Práctica de Fabricación y el desarrollo de este anexo tiene en cuenta estos puntos.

Personal

1. Todo el personal de áreas donde se elaboran productos farmacéuticos biológicos (incluso el afectado a tareas de limpieza, mantenimiento o control de calidad) debe recibir capacitación adicional específica sobre los productos elaborados y sus tareas. El personal debe recibir información y capacitación pertinente a higiene y microbiología.

2. Las personas responsables de la producción y del control de calidad deben contar con formación adecuada en disciplinas científicas pertinentes, como bacteriología, biología, biometría, química, medicina, farmacia, farmacología, virología, inmunología y medicina veterinaria, como así también suficiente experiencia práctica que les permita ejercer sus funciones en el proceso que corresponda.

3. Se debe considerar la condición inmunológica del personal por la seguridad del producto. En los casos en que sea necesario, se debe vacunar a todo el personal que participe en la producción, mantenimiento, evaluación y cuidado animal (e inspectores) con vacunas específicas apropiadas y se lo debe someter a exámenes médicos regulares. Aparte del problema de exposición del personal a agentes infecciosos, potentes toxinas o alergenos, es necesario evitar el riesgo de contaminación de un lote de producción con agentes infecciosos. Generalmente se debe excluir a los visitantes de las áreas de producción.

4 - Cualquier cambio en la condición inmunológica del personal que pudiere afectar la calidad del producto, impide el trabajo en el área de producción. La producción de la vacuna BCG y productos a base de tuberculinas se debe restringir a personal que es cuidadosamente monitoreado por controles regulares de su condición inmunológica y a exámenes radiográficos de rayos X.

5 - En el transcurso del día laboral el personal no debe trasladarse desde áreas donde es posible la exposición a organismos vivos o animales hacia áreas donde se manipulan otros productos u organismos diferentes. Si dicho traslado es inevitable, el personal que opere en tal producción debe adoptar medidas de descontaminación claramente definidas, incluyendo el cambio de vestimenta y calzado y, de ser necesario, se debe duchar.

Locales y equipamiento

6 - El grado de control ambiental de contaminación por partículas y microbiana de los locales de producción se debe adaptar al producto y a la etapa de producción, teniendo en cuenta el nivel de contaminación de las materias primas y el riesgo para el producto terminado.

7 - El riesgo de contaminación cruzada entre productos farmacéuticos biológicos, especialmente en las etapas del proceso de elaboración en el que se utilizan microorganismos viables, pueden requerir precauciones adicionales con respecto a las instalaciones y al equipamiento, tales como el uso de instalaciones y equipamiento dedicados, producción en campaña y el uso de sistemas cerrados. La naturaleza del producto y el equipamiento utilizado determinarán el nivel de segregación necesario para evitar la contaminación cruzada.

8 - Como principio, se deben utilizar instalaciones dedicados para la producción de la vacuna BCG y para el manipuleo de microorganismos vivos empleados en la elaboración de productos a base de tuberculinas.

9 - Se deben utilizar instalaciones dedicadas para el manipuleo de *Bacillus anthracis, Clostridium botulinum* y de *Clostridium tetani* hasta que se concluya el proceso de inactivación.

10 - Es aceptable la producción en campaña para otros microorganismos formadores de esporas, siempre y cuando las instalaciones sean dedicadas para este grupo de productos y no se procese más de un producto por vez.

11 - Es aceptable la producción simultánea en la misma área con la utilización de sistemas cerrados de biofermentadores para productos como anticuerpos monoclonales y productos preparados mediante técnicas de ADN-r, siempre y cuando se evite el riesgo de contaminación cruzada.

12 - Es aceptable realizar etapas de procesamiento después de la cosecha simultáneamente en la misma área de producción, siempre y cuando se tomen precauciones suficientes para evitar la contaminación cruzada. Para vacunas con microorganismos no viables o toxoides, tal proceso paralelo sólo se puede efectuar después de la inactivación del cultivo o después de la detoxificación.

13 - Se deben utilizar áreas de presión positiva para el proceso de productos estériles pero, debido a razones de contención, es aceptable la presión negativa en áreas específicas en puntos de exposición a patógenos.

Donde se utilizan áreas de presión negativa o gabinetes de seguridad para el procesamiento aséptico de patógenos, se debe proporcionar una zona circundante estéril de presión positiva.

14 - Las unidades de manejo de aire deben ser específicas para el área de procesamiento en cuestión y la recirculación de aire no debe provenir desde áreas donde se manipulan microorganismos patogénicos viables.

15 - La distribución y el diseño de las áreas de producción y equipamiento deben permitir la efectiva limpieza y descontaminación (por ej. por fumigación). Debe validarse la efectividad de los procedimientos de limpieza y descontaminación.

16 - El equipamiento utilizado en el manipuleo de microorganismos viables se debe diseñar a los efectos de mantener los cultivos en un estado puro, evitando la contaminación de fuentes externas, durante el procesamiento.

17 - Los sistemas de tuberías, válvulas y filtros de ventilación se deben diseñar de forma que faciliten la limpieza y la esterilización. Se debe promover el uso de los sistemas de “limpieza en el lugar” y “esterilización en el lugar”. Las válvulas de los recipientes de fermentación deben ser completamente esterilizables por vapor. Los filtros de venteo deben ser hidrofóbicos y debe establecerse y validarse su vida útil.

18 - El envase primario debe ser diseñado y controlado de forma de demostrar que no hay riesgo de pérdida del material.

19 - Los efluentes que puedan contener microorganismos patogénicos se deben descontaminar efectivamente.

20 - Debido a la variabilidad de productos o procesos biológicos, durante el proceso de producción se pueden medir o pesar algunos excipientes o ingredientes (por. ej. buffers). En estos casos, se pueden conservar en el área de producción pequeñas cantidades de estas substancias.

Bioterios y cuidados

21 - Para la elaboración de productos farmacéuticos biológicos se utilizan algunos animales, por ejemplo para la producción de: vacuna de la polio (monos), antídotos para veneno de serpientes (caballos y cabras), vacuna contra la rabia (conejos, ratones y hamsters) y gonadotrofina sérica (caballos). Además, pueden utilizarse animales en el control de calidad de la mayoría de los sueros y vacunas, por ej. vacuna contra pertusis (ratones), pirógenos (conejos), vacuna BCG (cobayos).

22 - Los bioterios[2] utilizados en la producción y control de los productos biológicos deben encontrarse separados de las áreas de producción y control. Se debe controlar y llevar registros de la condición sanitaria de los animales de los que derivan las materias primas y de aquellos utilizados para el control de calidad y en los ensayos de seguridad. Al personal que opere en dichas áreas se le debe proveer de vestuarios e indumentaria especial. Se requiere especial consideración en los casos en que se utilizan monos para la producción o control de calidad de medicamentos biológicos, según lo establecen los actuales "Requerimientos para Sustancias Biológicas Nro. 7 de la OMS".

Documentación

23 - Las especificaciones de las materias primas biológicas pueden requerir documentación adicional sobre la fuente, origen, método de elaboración y controles aplicados, en especial controles microbiológicos

.

24. Se deben establecer especificaciones para productos intermedios y graneles de medicamentos biológicos.

[2] Los requerimientos generales para Bioterios están dados en la Disposición ANMAT N°6344/96

Material de partida

25 - Se debe definir claramente la fuente, el origen y la aptitud de los materiales de partida. En los casos en que los ensayos necesarios llevan un tiempo prolongado, se puede permitir el procesamiento de las materias primas antes de disponer de los resultados de los ensayos. En dichos casos, la liberación del producto final debe estar sujeta a los resultados satisfactorios de los ensayos.

26 - En los casos en que se requiera esterilización de los materiales de partida, la misma debe ser térmica, en lo posible. De ser necesario, pueden utilizarse otros métodos apropiados para la inactivación de materiales biológicos (por ej. irradiación).

Sistema de lotes semilla y de banco de células

27. La elaboración de medicamentos de origen biológico obtenidos de cultivos microbianos, cultivos celulares de propagación en embriones y animales debe basarse en un sistema de banco celular madre y banco celular de trabajo, a fin de evitar la cambios indeseada de las propiedades bioquímicas, que pueda provenir de los subcultivos repetidos o generaciones múltiples.

28. El número de generaciones (duplicaciones, pasajes) entre el banco celular y el producto terminado debe corresponderse con la documentación de registro del producto. El escalado de los procesos no debe cambiar esta relación fundamental.

29. Los lotes semilla y los bancos de células deben ser adecuadamente caracterizados y analizados para detectar contaminantes. Su aptitud para el uso se debe demostrar mediante la consistencia de las características y la calidad de los sucesivos lotes del producto. Los lotes semilla y los bancos de células deben ser establecidos, almacenados y utilizados de forma tal que se minimicen los riesgos de contaminación o alteración.

30. El establecimiento del banco celular madre y del banco celular de trabajo debe realizarse en un entorno adecuadamente controlado para proteger ambas preparaciones de cualquier tipo de contaminación y, de corresponder, al personal que los manipule. Durante el establecimiento de un banco celular madre y un banco celular de trabajo no deben manipular simultáneamente en la misma área o por las mismas personas, microorganismos viables o material infeccioso (por ej., virus, líneas celulares, o cepas celulares).

31. Se deben documentar las pruebas de la estabilidad y recuperación de los bancos celulares. Los envases de almacenamiento deben encontrarse herméticamente cerrados, claramente rotulados y conservados a un temperatura apropiada. Se debe llevar un inventario detallado del material almacenado. Se debe registrar continuamente la temperatura de los freezers y se debe monitorear el nitrógeno líquido. Se debe registrar cualquier desvío de los límites establecidos y toda acción correctiva implementada.

32. La manipulación de estos materiales debe realizarse únicamente por personal autorizado y bajo la supervisión de una persona responsable. Se debe controlar y restringir el acceso al material almacenado. Los diferentes bancos de células se deben almacenar de manera tal que se evite la confusión o la contaminación cruzada. Es recomendable separar los bancos de células madre y bancos de trabajo y almacenarlos en ubicaciones diferentes, a fin de minimizar los riesgos de pérdida total.

33. Todos los contenedores de bancos células madre y de trabajo y los lotes semilla se deben tratar idénticamente durante el almacenamiento. Una vez extraídos del almacenamiento no pueden volver a formar parte del inventario.

Operaciones

34. Se debe demostrar las propiedades de promoción de crecimiento de los medios de cultivo.

35. La incorporación de materiales o cultivos a los fermentadores y a otros recipientes, como así también la toma de muestras, se debe llevar a cabo bajo condiciones estrictamente controladas para asegurar que se mantenga la ausencia de contaminación. Se debe asegurar que los recipientes están correctamente conectados entre sí al realizarse la incorporación de materiales o el muestreo.

36. La centrifugación y la mezcla de productos pueden dar lugar a la formación de aerosol, por lo que se deben tomar las medidas necesarias de contención de dichas actividades, para evitar la transferencia de microorganismos vivos.

37. De ser posible, se deben esterilizar los medios "*in situ*". Se debe emplear filtros esterilizadores en línea para las tareas de rutina de incorporación de gases, medios, ácidos, álcalis, agentes antiespumantes, etc. en los fermentadores, de ser posible.

38. Se debe tener una cuidadosa consideración a la validación de cualquier proceso de remoción o de inactivación viral que se lleven a acabo.

39. Para los casos en que se realicen procesos de remoción o inactivación de virus durante la elaboración, se deben tomar las medidas necesarias para evitar el riesgo de recontaminación de productos tratados por parte de productos no inactivado.

40. Para la cromatografía se utiliza una gran variedad de equipamiento, en general, dicho equipamiento debe ser dedicado a la purificación de un producto y se lo debe esterilizar o sanitizar entre lotes. Se debe evitar el uso del mismo equipamiento en diferentes etapas del procesamiento. Deben definirse los criterios de aceptación, vida útil y métodos de sanitización y esterilización de las columnas.

Control de calidad

41. Los controles en proceso juegan un rol especialmente importante para asegurar la consistencia en la calidad de los medicamentos biológicos. Aquellos controles que son esenciales para la calidad (por ej. Remoción viral) pero que no se pueden llevar a cabo en el producto terminado, deben llevarse a cabo en una etapa apropiada de la elaboración.

42. Deben conservarse muestras de productos intermedios en cantidades suficientes y bajo las apropiadas condiciones de almacenamiento, a fin de permitir la repetición o confirmación del control de un lote.

43. Es necesario el monitoreo continuo de ciertas etapas de producción, por ejemplo la fermentación. Estos datos deben constar en el registro de lote.

44. En los casos en los que se utilice un cultivo continuo, se debe dar especial consideración a los requerimientos de los controles de calidad relacionados a este tipo de método de producción.

ANEXO 3

BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACION DE PREPARACIONES RADIOFARMACEUTICAS

1. Alcances

Los presentes lineamientos se encuentran destinados a complementar aquellos establecidos en las Buenas Prácticas de Fabricación aplicables a medicamentos y medicamentos estériles.

La regulación aplicable al control de preparaciones o productos radiofarmacéuticos se encuentra determinada en gran medida, por la naturaleza de estos productos y los métodos de fabricación.

A los fines de la presente norma, las preparaciones o productos radiofarmacéuticas se clasifican en:

a) productos radiactivos listos para su uso

b) generadores de radionucleídos

c) componentes no radiactivos (“kits fríos ” o “juegos de reactivos”) utilizados en la preparación de compuestos marcados con un componente radiactivo (generalmente el eluído de un generador de radionucleídos)

d) precursores utilizados en la radiomarcación de otras sustancias previo a su administración (por ejemplo muestras de pacientes)

2. Generalidades

La fabricación y manipulación de medicamentos radiofarmacéuticos constituyen operaciones que implican riesgos potenciales inherentes a la naturaleza de estos productos asociados al tipo de radiación emitida y a la vida media de los isótopos radiactivos utilizados.

La elaboración de preparaciones radiofarmacéuticas debe ser realizada de conformidad con los principios básicos de Buenas Prácticas de Fabricación. En particular la elaboración y control de estos medicamentos deben contemplar las precauciones relacionadas con la radioprotección, prevención de contaminación cruzada y diseminación de contaminantes radiactivos y la eliminación de deshechos radiactivos, establecidas en reglamentaciones nacionales e internacionales.

Las consideraciones contempladas en el presente Anexo deben ser entendidas como suplementarias a los requerimientos generales de BPF y específicas para estos productos.

Debido a que algunas preparaciones radiofarmacéuticas son liberadas y administradas al paciente a poco de su elaboración, el control de calidad resulta en ciertos casos retrospectivo. Por lo expuesto, el cumplimiento estricto de BPF resulta imprescindible así como también una evaluación continua de la eficacia del Sistema de Calidad.

3. Personal

3.1 Las actividades de elaboración e importación de productos radiofarmacéuticos debe ser realizada bajo la responsabilidad de un profesional con formación académica y experiencia demostrada en radiofarmacia y radioprotección. El mismo deberá contar con la autorización de la Autoridad Nuclear Competente.

3.2. El personal afectado a las operaciones de fabricación y manipulación de productos radiactivos debe poseer formación complementaria ya sea de post grado o mediante entrenamiento técnico, y experiencia apropiada para dichas funciones. Asimismo deberá recibir información y formación sobre los aspectos relacionados con la radioprotección.

3.3. El personal afectado al manipuleo de productos radiactivos o a tareas que deban realizarse en áreas Limpias o asépticas debe ser cuidadosamente seleccionado. A tal fin deberá considerarse su capacidad para seguir estrictamente los principios de BPF y su estado de salud de manera tal que la integridad de los productos no se encuentre comprometida.

3.4 La evaluación del estado de salud deberá realizarse antes del empleo del personal y periódicamente luego de su ingreso. Ante cualquier alteración del mismo el personal deberá ser separado de actividades que impliquen su exposición a radiaciones.

3.5. En las áreas limpias o asépticas sólo deberá estar presente el personal mínimo necesario para la ejecución del trabajo.

3.6. Durante la elaboración de radiofármacos, juegos de reactivos o productos estériles, el acceso a estas áreas estará restringido. Los procedimientos de inspección y control deberán ser realizados, dentro de lo posible, fuera de estas áreas.

3.7. La movilización del personal entre áreas radiactivas y no radiactivas sólo podrá realizarse si son respetadas estrictamente normas de seguridad de radioprotección.

3.8. Deberá establecerse un sistema de capacitación continua del personal que contemple

su entrenamiento en Buenas Prácticas de Fabricación, manejo seguro de materiales radiactivos y procedimientos de radioprotección y permita a su vez su acceso al conocimiento de los últimos desarrollos en los diferentes campos de interés. Deberán ser mantenidos los registros de la capacitación y realizar una evaluación de la eficacia del programa de entrenamiento.

3.9. Todo personal involucrado en actividades de producción, almacenamiento y control de productos radiactivos debe seguir estrictamente las normas establecidas para el manejo de estos productos y ser monitoreados por posibles exposiciones a radiaciones y/o contaminación.

4. **Infraestructura edilicia- equipamiento**

4.1 Las instalaciones deben estar localizadas, diseñadas, construidas y mantenidas conforme a las operaciones que sean realizadas en las mismas.

4.2. Las áreas donde sean manipulados materiales radiactivos deberán estar diseñadas teniendo en consideración aspectos relacionados con la radioprotección, además de aquellos relativos a las condiciones de limpieza y esterilidad, cuando corresponda.

4.3. De acuerdo al riesgo radiológico las áreas de clasificarán en controladas, supervisadas y de libre circulación debiendo estar definidos los requisitos de acceso.

4.4. Las superficies internas (pisos, paredes y techos) no deben desprender partículas, deben ser lisas, impermeables y libres de grietas y permitir su fácil limpieza y descontaminación.

4.5. Debe disponerse de sistemas específicos para la eliminación de efluentes radiactivos. Estos sistemas deben ser efectivos y cuidadosamente mantenidos de manera de prevenir contaminación o exposición del personal a deshechos radiactivos tanto dentro como fuera de las instalaciones.

Deben tomarse las precauciones necesarias para evitar contaminación del sistema de drenaje con efluentes radiactivos.

4.6. Todas las instalaciones y áreas deben encontrarse en buen estado de conservación y limpieza, realizándose revisiones regulares y reparaciones cuando y donde resulte necesario.

4.7. Las instalaciones deben proveer suficiente espacio para llevar a cabo las operaciones permitiendo un eficiente flujo de trabajo y una comunicación y supervisión efectiva. Todas las instalaciones deben encontrarse limpias, en condiciones sanitarias y libres de contaminación radiactiva.

4.8. La iluminación, sistemas de calefacción y ventilación, y de resultar necesario de acondicionamiento de aire, debe estar diseñado para mantener una temperatura satisfactoria y humedad relativa que aseguren el confort del personal que deba trabajar con vestimenta protectora.

4.9. El sistema de ventilación de las áreas productivas de preparaciones radiofarmacéuticas debe cumplir con los requerimientos para la prevención de contaminación de los productos y la exposición del personal a la radiactividad.

4.10. Los sistemas de aire, tanto el correspondiente a las áreas radiactivas como a las no radiactivas, deben estar provistos de alarmas que permitan advertir al personal sobre posibles fallas del sistema.

4.11. Las áreas de producción y fraccionamiento deberán contar con blindajes y visores blindados.

4.12. La elaboración de productos radiofarmacéuticos derivados de sangre o plasma humano deberán realizarse en áreas segregadas y con equipos dedicados.

4.13. Las autoclaves utilizadas dentro de las áreas productivas de preparaciones radiofarmacéuticas deberán estar provistas de la protección adecuada a fin de minimizar la exposición de los operadores a la radiación. Inmediatamente luego de su utilización, deberá verificarse la ausencia de contaminación en las mismas a fin de minimizar la posibilidad de contaminación cruzada por radiactividad entre productos en los próximos ciclos de autoclavado.

4.14. A fin de prevenir riesgos por contaminación cruzada, deberán adoptarse todas o algunas de las siguientes medidas:

a) procesamiento y envasado en áreas segregadas

b) evitar la fabricación simultánea de más de un producto radiactivo en el mismo puesto de trabajo a fin de disminuir el riesgo de contaminación cruzada o sustitución, excepto que se encuentren efectivamente segregados.

c) transferencia de material a través de airlocks, extracción de aire, cambio de vestimenta y lavado y decontaminación cuidadosa del equipamiento.

d) protección contra riesgos de contaminación por recirculación de aire no tratado o por re-ingreso accidental de aire extraído.

e) utilización de sistemas cerrados de elaboración.

f) prevención de formación de aerosoles.

g) utilización de recipientes esterilizados.

4.15. Todos los envases que contengan preparaciones radiofarmacéuticas, independientemente de su estado dentro del proceso de manufactura, deberán estar correctamente identificados mediante rótulos seguros.

4.16. La elaboración de productos estériles debe realizarse en áreas bajo presión positiva. Por lo general, el material radiactivo debe ser manipulado en áreas específicamente diseñadas mantenidas bajo presión negativa.

4.17. La elaboración de productos radiactivos estériles debe ser llevada a cabo en áreas bajo presión negativa rodeada de un área con presión positiva, asegurando el cumplimiento de los requisitos en cuanto a la calidad del aire.

Para productos estériles, la zona de trabajo donde los productos o envases pueden estar expuestos, deben cumplir con los requerimientos ambientales descriptos en el Anexo 1 de "Elaboración de Medicamentos Estériles".

4.18. Deberá disponerse de unidades de manejo de aire independientes para las áreas radiactivas y áreas no radiactivas. El aire proveniente de las áreas donde hayan sido manipulados materiales radiactivos deberá ser eliminado a través de filtros apropiados, verificando su desempeño periódicamente.

4.19. Las cañerías, válvulas y filtros de venteo deben estar diseñados de forma tal que permitan la validación de limpieza y decontaminación.

4.20. Los productos radiactivos, deben almacenarse, procesarse, acondicionarse y controlarse en instalaciones dedicadas y autocontenidas.

5. Producción

5.1. Todos los procesos de producción deberán ser realizados siguiendo procedimientos escritos, llevando los registros correspondientes. Los mismos deben ser periódicamente revisados y actualizados.

5.2. Todos los registros de producción deben estar inicialados por el operador y verificado en forma independiente por otro operador o supervisor.

5.3. Las especificaciones de la materia prima deben incluir detalles de su fuente, origen y, cuando corresponda, el método de elaboración y los controles utilizados para asegurar su adecuación para el uso propuesto. En ciertos casos la liberación del producto terminado se encuentra condicionada por los resultados satisfactorios obtenidos en los ensayos de los insumos y materia prima.

5.4. Deberá prestarse especial consideración en la validación de métodos de esterilización.

5.5. En la preparación del producto radiofarmacéutico es utilizado una amplia variedad de equipamiento. Cuando se utilicen técnicas cromatografícas para la preparación y purificación de productos deberá evitarse la contaminación cruzada radioactiva, por lo general mediante el uso de equipos dedicados a uno o varios productos marcados con el mismo radionucleido. Deberá estar definido el período de vida útil de las columnas.

5.6. Deben tomarse recaudos en la limpieza, esterilización y funcionamiento de los liofilizadores utilizados en la preparación de juegos de reactivos.

5.7. Debe disponerse de un listado de equipamiento y dispositivos críticos incluyendo balanzas, estufas de despirogenado, dosímetros, filtros esterilizantes, entre otros.

5.8. Estos deben ser calibrados y controlados a intervalos regulares y verificados diariamente o antes del inicio de la producción, teniendo en cuenta que un error en la lectura y funcionamiento de los mismos pueden potencialmente causar un perjuicio al paciente. Los resultados de estos ensayos deben incluirse en los registros diarios de producción

5.9. Deberá disponerse de equipos y dispositivos específicos para la medición radiactiva como así también de estándares de referencia. Para la medición de vida media muy corta deberá contactarse con la Autoridad Nuclear competente para la calibración del equipamiento.

5.10. La elaboración y control de kits reactivos deberá realizarse según las recomendaciones generales de Buenas Prácticas de Fabricación aplicables a medicamentos estériles.

5.11. En caso de utilizar gas inerte para el llenado de los viales el mismo deberá ser filtrado a fin de evitar la contaminación microbiana.

5.12. El acondicionamiento y transporte de radiofármacos deberá ser realizado siguiendo las normas vigentes en materia de radioprotección.

6. Documentación

6.1. El sistema de documentación deberá seguir los lineamientos generales contemplados en la BPF

6.2. Los registros para la recepción, el almacenamiento, uso y descarte de material radiactivo deberán ser mantenidos y llevados conforme a la reglamentación vigente en materia de radioprotección.

6.3. Los registros de procesamiento de lotes deben incluir la historia completa de fabricación de cada lote de radiofármaco demostrando que el mismo ha sido elaborado, controlado, envasado y distribuido de conformidad con procedimientos escritos.

6.4. Debe llevarse un registro de distribución de todos los productos, y disponer de procedimientos escritos que indiquen las medidas a adoptar para el recupero de productos defectuosos liberados al mercado.

6.5. Dado que la devolución de productos radiactivos no resulta práctica, el objetivo del procedimiento de recupero de estos productos se encuentra relacionado con la necesidad de prevenir su uso en el paciente en lugar de lograr el recupero efectivo de los mismos. De resultar necesario, la devolución de productos radiactivos debe llevarse a cabo de conformidad con las regulaciones nacionales y/o internacionales en materia de transporte de material radiactivo.

6.6. El elaborador del producto radiofarmacéutico deberá poder demostrar que el sistema de retiro del mercado adoptado permite llevar la operatoria eficazmente y dentro de períodos relativamente cortos.

7. Aseguramiento de calidad y control de calidad

7.1. Los lotes de productos radiofarmacéuticos con radionucleídos de período de semidesintegración demasiado corto son por lo general liberados para su administración antes de la obtención de los resultados de los ensayos de control de calidad. En estos casos los ensayos constituyen controles del proceso de elaboración. Por lo expuesto, la validación del proceso de elaboración empleado resulta crítica y la implementación y cumplimiento de un Programa de Aseguramiento de la calidad esencial.

7.2. Las principales responsabilidades de Aseguramiento de Calidad y/ o control de calidad son:

a) preparación de instrucciones detalladas para cada ensayo y análisis

b) asegurar la identificación adecuada y la segregación de muestras para analizar evitando mezclas, sustituciones o contaminación cruzada

c) asegurar que el monitoreo ambiental y la validación de equipos y procesos sean llevados a cabo de manera apropiada a fin de evaluar la adecuación de las condiciones de elaboración

d) liberar o rechazar materias primas, insumos y productos intermedios

e) aprobar o rechazar material de acondicionamiento y rotulado

f) aprobar o rechazar cada lote de producto terminado

g) evaluar la adecuación de las condiciones bajo las cuales las materias primas, insumos, producto intermedio y producto terminado son almacenados

h) evaluar la calidad y estabilidad de los productos terminados y, cuando resulte necesario, de las materias primas y de los productos intermedios

i) establecer las fechas de vencimiento sobre la base del periodo de vida útil y su relación con condiciones específicas de almacenamiento y un programa de estabilidad

j) establecer y revisar las especificaciones y los procedimientos de control

k) asumir la responsabilidad por las muestras de retención de productos radiofarmacéuticos

l) asumir la responsabilidad para mantener registros adecuados de distribución de productos radiofarmacéuticos

7.3. La distribución de productos radiofarmacéuticos de vida media muy corta, liberados previo a la finalización de todos los controles, no releva al Profesional Responsable de su obligación de tomar la decisión sobre la conformidad del lote, debiendo quedar ésta formalmente registrada.

En estos casos deberá disponerse de procedimientos escritos que describan todas los aspectos relacionados a la producción y al control de calidad que deben ser considerados, examinados y evaluados previo a la liberación del lote.

Asimismo deberá existir un procedimiento escrito en el que se encuentren establecidas las acciones a tomar en caso de obtener resultados no satisfactorios una vez finalizado los controles de calidad

7.4. Las responsabilidades de Aseguramiento de la Calidad y Control de calidad deben estar organizadas en grupos separados.

7.5. Aseguramiento de la calidad debe incluir el monitoreo y validación de los procesos productivos.

7.6. Control de calidad deberá ser independiente de producción y funcionar como una unidad autosuficiente en áreas destinadas a tal fin.

El laboratorio deberá estar diseñado, instalado y equipado de manera de poder llevar a cabo todos los ensayos necesarios, llevar los registros correspondientes y permitir el correcto almacenamiento de muestras y documentación.

7.7. El elaborador de preparaciones radiofarmacéuticas deberá realizar todos los controles cualitativos y cuantitativos establecidos en las especificaciones de materia prima.

Estos solo podrán ser reemplazados por un sistema de certificación del material por parte del proveedor calificado y bajo las siguientes condiciones:

a) Existencia de historia de producción confiable

b) El elaborador o proveedor de la materia prima es auditado regularmente

c) Por lo menos un ensayo de identidad es realizado por el elaborador del producto radiofarmacéutico.

7.8. Los procedimientos de muestreo deben ser adecuados para el propósito del muestreo, el tipo de controles y la naturaleza del material a muestrear (por ejemplo tamaño pequeño de lote, contenido radiactivo, etc.) El procedimiento debe estar descripto en un protocolo escrito.

7.9. Deberán conservarse muestras de referencia de cada lote de producto intermedio o producto terminado en cantidad suficiente, bajo condiciones de almacenamiento que permitan repetir los ensayos o verificar los ya realizados en caso de ser requerido.

Estas muestras deben ser conservadas por periodos apropiados en conforme al período de semidesintegración del componente radiactivo involucrado, no siendo esto aplicable para radiofármacos de vida media muy corta.

8. Rotulado

Todos los productos deben encontrarse claramente identificados mediante rótulos los que deben permanecer en sus envases respectivos durante todas las etapas productivas y condiciones de almacenamiento.

ANEXO 4

APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE PELIGROS Y PUNTOS CRÍTICOS DE CONTROL EN LA PRODUCCIÓN DE MEDICAMENTOS

1. Introducción

Esta metodología apunta a prevenir peligros conocidos y a reducir los riesgos de su ocurrencia en puntos específicos. Este texto proporciona lineamientos generales para el uso del sistema HACCP en el aseguramiento de la calidad de medicamentos, aún cuando detalles de su aplicación puedan variar según las circunstancias. Este anexo no provee información detallada de los peligros principales.

Los procedimientos (entre los que se incluyen las BPF), atienden las condiciones de operación y proveen las bases para el sistema HACCP. El HACCP es un método sistemático para la identificación, valoración y control de peligros que afecten la seguridad.

Además el HACCP puede extender este concepto, incluyendo un análisis de las variables críticas de la calidad al igual que una valoración de los peligros que afectan la seguridad de los trabajadores y peligros de contaminación del medio ambiente directamente relacionado a los procesos concernientes (en particular en sistemas abiertos).

Las BPF para medicamentos requieren, tanto la validación de los procesos críticos, como de los cambios en los procesos de manufactura que pueden afectar la calidad del producto final. La experiencia muestra que muchos procesos de manufactura contienen etapas que son críticas desde el punto de vista de la variación en la calidad final.

El HACCP es una herramienta para valorar peligros y establecer sistemas de control centrados en la prevención, en lugar de confiar en acciones correctivas basadas en el control final del producto. Todo sistema HACCP es capaz de adaptarse a cambios, tales como avances en diseño de equipos y procesos productivos u otros desarrollos tecnológicos.

2. Principios

El sistema HACCP se basa en siete principios. Para la aplicación de estos principios, se recomienda desarrollarlos en 14 etapas, las cuales son propuestas en la sección 5.

Algunas etapas están relacionadas con principios específicos, mientras que otras sirven como una introducción a los conceptos.

Los siete principios son:

1) Realizar un Análisis de Peligros

2) Determinar los Puntos Críticos de Control

3) Establecer los parámetros y límites críticos

4) Establecer un sistema de monitoreo de los PCC

5) Establecer las acciones correctivas a realizar cuando el monitoreo indique que un PCC no esta bajo control.

6) Establecer documentación concerniente a todos los procesos y conservar los registros apropiados a esos principios y su aplicación.

7) Establecer procedimientos para verificar que el sistema HACCP esta trabajando efectivamente.

3. Requisitos previos para la aplicación del sistema HACCP

Los siguientes lineamientos deben ser utilizados en la aplicación del sistema HACCP:

a) Antes que el sistema HACCP sea aplicado a un determinado sector, el mismo, debe estar operando de acuerdo con los principios de las BPF.

b) Es necesario un comité de gestión de la calidad para implementar un sistema HACCP.

c) El HACCP debe ser aplicado a cada etapa específica separadamente.

d) Los PCC que son dados como un ejemplo determinado en algún documento (incluido en las BPF) puede no ser el único identificado para una aplicación específica o puede ser de una naturaleza diferente.

e) La implementación del HACCP debe ser revisada y necesariamente cambiada cuando se realice alguna modificación en el producto, proceso o etapa.

f) En la implementación del HACCP es necesario tomar en cuenta la naturaleza y el tamaño de la operación.

g) El formato de cada plan HACCP puede variar, pero deben ser preferentemente específicos para cada producto, proceso u operación en particular. Los planes HACCP generales pueden servir como guías útiles en el desarrollo de planes

específicos para productos o procesos; sin embargo, es esencial que las condiciones únicas dentro de cada uno de ellos sean consideradas durante el desarrollo de todos los componentes del plan HACCP.

4. Entrenamiento y capacitación

4.1 - Para la efectiva implementación de un plan HACCP, se debe capacitar al personal en lo que respecta los principios y aplicación del HACCP.

4.2 - En el desarrollo del entrenamiento especifico para sustentar un plan HACCP, las instrucciones de trabajo y los procedimientos deben formularse por escrito para definir las tareas del personal operativo destinado a cada PCC. Los encargados de monitorear cada PCC deben recibir entrenamiento específico.

4.3 - La capacitación, información y entrenamiento debe ser provista sobre el control de peligros en todas las etapas de producción y abastecimiento.

4.4 - El personal debe comprender que el HACCP esta implementado, y que el informarse es necesario para que este funcione de manera adecuada, y también que los materiales y equipamientos necesarios deben ser provistos para el control de los PCC.

4.5 - Todo el entrenamiento y capacitación del personal que interviene en el plan HACCP debe ser registrado.

5. Aplicacion

5.1 - *Principio:* La aplicación de los principios del HACCP debe consistir en las etapas descriptas de 5.2 a 5.15 como una secuencia lógica para la aplicación del sistema HACCP.

5.2 - *Definir el alcance del Plan HACCP*. Se debe definir el alcance del plan HACCP y debe describir los segmentos de la producción involucrados e identificar las clases de peligros a ser tratados.

5.3 - *Ensamblar un equipo HACCP:* La elaboración de medicamentos debe asegurar que el conocimiento y la experiencia de productos específicos esté disponible para el desarrollo de un efectivo plan HACCP. Esto puede ser alcanzado de mejor manera mediante la elección de un equipo multidisciplinario. Los miembros del equipo deberían provenir de todas las áreas relevantes, como ser investigación y desarrollo, producción, control de calidad, aseguramiento de calidad, microbiología, ingeniería y distribución u otras. Los miembros del equipo deben tener conocimientos específicos y experiencia relacionada a los productos y los procesos. En las áreas donde no se cuenta con experiencia, pueden ser incorporados asesores externos. Los miembros del equipo deben ser capaces de:

a) Realizar un análisis de peligros
b) Identificar los peligros potenciales
c) Identificar los peligros que deben ser controlados
d) Recomendar controles y limites críticos
e) Diseñar procedimientos de monitoreo y verificación
f) Establecer las acciones correctivas apropiadas cuando ocurra una desviación
g) Verificar el plan HACCP

5.4 - *Describir los productos y procesos:* Se debe realizar una descripción total del producto y de los procesos involucrados, incluyendo información relevante relacionada con la calidad como ser, la composición, propiedades físico - químicas, estructura, pH, temperaturas, métodos de limpieza, tratamientos bacteriológicos o bacteriostáticos (por ejemplo esterilización por calor), secado, mezclado, combinación de fases, acondicionamiento y condiciones de almacenamiento. El método de distribución y transporte también debe ser descripto, especialmente cuando los productos son termolábiles.

5.5 - *Identificar de la intención de uso:* La intención de uso debe estar basada en la expectativa de uso por parte del consumidor final. Deben ser considerados casos específicos como ser grupos vulnerables, por ejemplo, pacientes geriátricos, pacientes pediátricos e inmunosuprimidos.

5.6 - *Construir un di agrama de flujo:* El diagrama de flujo debe ser construido por el equipo HACCP, y debe cubrir todas las operaciones y decisiones del proceso. Cuando el sistema HACCP es aplicado a una etapa especifica, se deben considerar la etapa anterior y la posterior a esta operación. Un diagrama de flechas y cuadros puede ser suficientemente descriptivo.

5.7 - *Confirmar el diagrama de flujo.:* El equipo HACCP debe confirmar el diagrama de flujo en comparación con las operaciones de producción durante todos los estadios y tiempos de operación. Las modificaciones al diagrama de flujo deben ser realizadas cuando sea apropiado, lo cual debe quedar registrado.

5.8 - *Realizar un listado de todos los peligros potenciales asociados a c ada etapa, realizar un análisis de riesgos y considerar alguna medida de control para los peligros identificados (Principio 1)*. Cuando se realiza el análisis de riesgo, los peligros relacionados con la seguridad deben ser distinguidos de los peligros concernientes a la calidad.

5.8.1 - El equipo HACCP debe listar todos los peligros que pueden ser razonablemente esperados que ocurran en cada etapa consideradas de la elaboración, control, depósito y distribución.

5.8.2 - Se debe realizar un análisis de peligro para identificar que, para los peligros de cada naturaleza, se elimine o reduzca su riesgo a un nivel aceptable. Se requiere un minucioso análisis de peligros para asegurar un efectivo punto de control. Se recomienda dos etapas para el análisis de peligros:

a) Durante la primera etapa el equipo debería revisar los materiales, actividades, equipamiento, acondicionamiento, distribución e intención de uso del producto.

b) Debe ser diseñada una lista de los potenciales peligros (biológicos, químicos y físicos) que pueden ser introducidos, incrementados o controlados en cada etapa. Cuando sea posible, lo siguiente debe ser incluido en el análisis de peligros:

   1) La probable ocurrencia de peligros y la severidad de sus efectos adversos a la salud

   2) La evaluación cualitativa/ cuantitativa de la presencia de los peligros

   3) La supervivencia o multiplicación de microorganismos de preocupación

   4) La producción o persistencia en drogas de toxinas, químicos o agentes físicos las condiciones principales para lo anteriormente dicho

c) Durante la segunda etapa, debe realizarse una evaluación de los riesgos, dónde debe ser estimada la severidad de los peligros potenciales y la probabilidad de su ocurrencia. El equipo debe luego decidir que peligros potenciales deben ser tratados en el plan HACCP, y que medidas de control pueden ser aplicadas, si existe, para cada peligro. Más de una medida de control puede ser requerida para controlar un peligro específico y más de un peligro puede ser controlado mediante una medida de control específica. Deben ser considerados, como mínimo, peligros potenciales en relación a:

   1) materiales e ingredientes

   2) características físicas y composición del producto

   3) procedimientos productivos

   4) instalaciones

   5) equipamiento

   6) acondicionamiento

   7) sanitización e higiene

   8) personal

   9) riesgos de explosión

   10) confusión

5.9 - *Determinar los Puntos Críticos de Control. (Principio 2).* Se deben determinar los Puntos de Control que sean Críticos para cada etapa, proceso o segmento de la línea productiva considerada. Un PCC en el sistema HACCP puede ser mas fácilmente determinado mediante el uso de un árbol de decisiones, que facilita un abordaje lógico. El modo que un árbol de decisiones es usado podría depender de la operación involucrada, por ejemplo, producción, acondicionamiento, almacenamiento o distribución. Se debe dar entrenamiento en el uso del árbol de decisiones. Si un peligro fue identificado en una etapa donde el control es necesario para la seguridad, y la medida de control no existe en esta etapa, o en alguna otra, el producto o el proceso debe ser modificado en esta etapa, o en una etapa anterior o posterior, incluyendo una medida de control.

5.10 - *Establecer los parámetros y límites críticos para cada PCC. (Principio 3).* Los límites críticos deben ser especificados y verificados para cada punto crítico de control. Más de un límite crítico puede, algunas veces, ser establecido para una etapa en particular. Con frecuencia el criterio utilizado incluye mediciones de temperatura, tiempo, nivel de humedad, pH, y parámetros

sensoriales tales como apariencia y textura. Los límites críticos deben estar basados científicamente.

5.11 - *Establecer un sistema de monitoreo para cada PCC. (Principio 4).* El monitoreo es el proceso de mediciones u observaciones de un PCC relativo a sus limites críticos. El monitoreo debe estar establecido y ser registrado.

5.11.1 - El procedimiento de monitoreo utilizado debe ser capaz de detectar una perdida de control de un PCC, y esta información debe estar disponible en tiempo para realizar ajustes, para asegurar el control del proceso y prevenir violaciones a los limites críticos. Cuando sea posible, se debe realizar modificaciones del proceso, cuando los resultados del monitoreo indican una tendencia hacia la perdida de control de un PCC. Estos ajustes deben ser realizados antes que ocurra la desviación.

5.11.2 - Los datos derivados del monitoreo deben ser evaluados por una persona asignada, y con el conocimiento y autoridad suficiente para llevar a cabo acciones correctivas cuando sea necesario.

5.11.3 - Si el monitoreo es discontinuo la cantidad o la frecuencia de las mediciones deben ser las suficientes para garantizar que el PCC esta bajo control. Muchos procesos de monitoreo para PCC podrían necesitar ser realizados rápidamente porque ellos se relacionan a procesos en línea y estos no podrían ser largos ensayos analíticos. Por esta razón, mediciones físicas y químicas son frecuentemente preferidas a ensayos microbiológicos porque ellas pueden ser realizadas rápidamente y pueden frecuentemente dar idea del estado microbiológico del producto.

5.11.4 - El personal que realiza el monitoreo de PCC y las medidas de control, deben ser parte del área o departamento producción (por ej. supervisores de línea, personal de mantenimiento) y, cuando sea apropiado, personal de control de calidad. Ellos deben ser entrenados en procesos de monitoreo.

5.11.5 - Cuando se utilice un monitoreo continuo, se debe establecer su frecuencia de registro y la recolección de datos debe realizarse de manera estadística o por un sistema de muestreo.

5.11.6 Todos los registros y documentos asociados con el monitoreo de PCC deben ser firmados y fechados mediante la(s) persona(s) que lleva a cabo el monitoreo y revisados por el responsable correspondiente.

5.12 - *Establecer acciones correctivas (Principio 5).* Se deben desarrollar acciones correctivas específicas para cada PCC para ser implementadas cuando ocurre una desviación de los límites críticos.

5.12.1 - Las acciones correctivas deben asegurar que el PCC vuelva a estar bajo control. Las acciones correctivas deben incluir, al menos, lo siguiente:

c) Determinación y corrección de la causa del incumplimiento;

d) Determinación del destino del producto fuera de límites;

e) Registro de la(s) acción(es) correctiva(s) que ha(n) sido tomada(s);

5.12.2 - Las acciones correctivas específicas deben estar definidas por adelantado para cada PCC y estar incluidas en el plan de HACCP. Como mínimo, el plan HACCP debe especificar: que se debe hacer cuando ocurre una desviación, quien es responsable de ejecutar las acciones correctivas, y que el registro de las acciones tomadas sea guardado y mantenido. Se les debe asignar la responsabilidad de la aplicación de acciones correctivas a los individuos que tienen una comprensión cuidadosa del proceso, del producto y del plan de HACCP.

5.12.3 - Los procedimientos de la disposición del producto y las desviaciones deben ser documentadas en los registros del plan HACCP.

5.13 - *Establecer un s istema de registro y documentación (Principio 6)*. Se debe establecer un sistema de registro y documentación eficiente y adecuado, lo cual es esencial para la aplicación de un sistema HACCP, y debe ser apropiado para la naturaleza y magnitud de la operación.

a) Se debe documentar, como mínimo, las siguientes actividades:
    1. Análisis de Riesgos;
    2. Determinación de los PCC;
    3. Plan HACCP;
    4. Determinación de los límites críticos;
b) Se debe registrar, como mínimo, las siguientes actividades:
    5. Monitoreo de los PCC;
    6. Etapas procesadas;
    7. Peligros asociados;
    8. límites críticos;

9. procedimientos y listados de verificación;
10. desviaciones;
11. acciones correctivas asociadas;
12. modificaciones al sistema HACCP;

5.14 - *Revisar el plan HACCP.* Se debe realizar una revisión inicial del plan de HACCP para determinar si se han sido identificados todos los peligros y, si el plan HACCP se ejecuta correctamente, estos peligros sean controlados con eficacia.

5.15 - *Establecer los procedimientos de verificación (Principio 7)*. Se debe establecer procedimientos para verificar que el sistema HACCP implementado es efectivo.

a) 5.15.1 - Se pueden utilizar, para determinar si el sistema de HACCP está trabajando correctamente, los métodos de verificación y auditoria, procedimientos y ensayos, incluyendo el muestreo aleatorio y su análisis. La frecuencia de la verificación debe ser suficiente para confirmar el funcionamiento apropiado del sistema HACCP. Ejemplos de las actividades de la verificación incluyen:

b) revisión del sistema de HACCP y de sus registros;

c) revisión de desviaciones y la disposiciones del producto;

d) confirmación que los PCCs son mantenidos bajo control.

5.15.2 - La revisión de la información para verificar el plan de HACCP debe incluir:

a) Estudios científicos;

b) Observaciones, mediciones y evaluaciones en planta. Por ejemplo, para la verificación del proceso de esterilización térmica por calor húmedo de inyectables estériles, debe incluir la justificación científica de una destrucción apropiada de los microorganismos patógenos y que los estudios de los tiempos de calentamiento, presión y temperaturas, son necesarias para confirmar que las condiciones de esterilización aseguren que la carga entera esté mantenida a la temperatura requerida por el tiempo requerido.

5.15.3 - Las verificaciones posteriores se deben realizar y documentar por el equipo HACCP. Las verificaciones deben hacerse cuando hay un fallo inexplicable del sistema, cuando ocurre un cambio significativo en el producto, proceso o acondicionamiento, o cuando se reconocen nuevos peligros.

5.15.4 - Se debe realizar una evaluación comprensiva periódica del sistema por una parte imparcial o terceros independientes del plan HACCP. Esto debe incluir una evaluación técnica del análisis de peligro y de cada elemento del plan HACCP, así como una revisión en el sitio de todos los diagramas flujo y los registros apropiados de las operaciones del plan. Esta verificación comprensiva es independiente de los otros procedimientos de verificación y se debe realizar para asegurar que el plan HACCP da como resultado el control de los todos los peligros.

5.15.5 - Si los resultados de la verificación comprensiva identifican deficiencias, el equipo HACCP debe modificar el plan HACCP como sea necesario.

5.15.6 - Los individuos que realicen la verificación deben tener un criterio técnico apropiado para realizar esta función. En lo posible, la verificación debe incluir acciones para confirmar la eficacia de todos los elementos del plan HACCP.

GLOSARIO

Acción correctiva - Cualquier acción a ser tomada cuando los resultados del monitoreo de un PCC indican una perdida de control.

Análisis de Peligro - El proceso de recolección y evaluación de información que debe ser realizado en el plan HACCP.

Control - El estado en el cual se han seguido los procedimientos correctos y en el cual se están cumpliendo los criterios establecidos.

Controlar - Realizar todas las acciones necesarias para asegurar el cumplimiento de los criterios establecidos en un plan HACCP.

Desviación - El no cumplimiento de un límite crítico.

Diagrama de flujo - Representación sistemática de la secuencia de pasos u operaciones involucradas en la fabricación de un medicamento.

Límite crítico - Criterio que separa la aceptabilidad de la inaceptabilidad.

Medida de control - Cualquier acción y actividad que puede ser usada para prevenir o eliminar un peligro que pueda afectar la calidad del medicamento o reducir el riesgo a un nivel aceptable.

Monitoreo - El acto de conducir una secuencia planeada de observaciones o mediciones de parámetros de control para reconocer si un PCC está bajo control.

Plan HACCP - Documento preparado según los principios del HACCP para asegurar, en un segmento de la línea productiva, el control de los riesgos que son significativos para la calidad del medicamento.

Punto Crítico de Control (PCC) - Paso en el cual se puede aplicar el control, y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro que puede afectar la calidad del medicamento o reducir el riesgo a un nivel aceptable.

Peligro - Cualquier circunstancia en la producción, control y distribución de medicamentos que puede causar un efecto adverso para la salud o un desvío de la calidad.

Validación - Colección y evaluación de datos, provenientes del proceso de etapas de desarrollo y continuando hacia las fases de producción, que asegura que los procesos de elaboración (incluyendo equipamiento, instalaciones, personal y materiales) son capaces de proporcionar los resultados esperados en forma consistente y continua. Validación es el establecimiento de evidencia documentada que un sistema hace lo que tiene que hacer.

Verificación - La aplicación de métodos, ensayos, controles y otras evaluaciones, además del monitoreo, para determinar el cumplimiento del plan HACCP.

ANEXO 5

RECOMENDACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD – BIOEQUIVALENCIA

ETAPA ANALÍTICA

Introducción

La calidad y la confiabilidad de los resultados analíticos de las muestras obtenidas en los estudios farmacocinéticos de bioequivalencia constituye uno de los factores más críticos en el desarrollo de los mismos ya que requiere de la determinación de bajas concentraciones de drogas y/ o metabolitos en matrices complejas.

Los laboratorios que participen en estos estudios deberían adecuarse a las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) de manera de generar resultados técnicamente válidos.

El aseguramiento integral de la calidad de los estudios de bioequivalencia constituye un elemento crucial para acreditar la confianza en la exactitud, validez y credibilidad de los resultados obtenidos.

La implementación de procedimientos de inspección y auditoría que controlen el cumplimiento de los protocolos, la selección de los sujetos, la verificación del cumplimiento del diseño del estudio, así como la recolección, manipulación y almacenamiento de las muestras biológicas y la validación de los métodos analíticos, junto con los procedimientos estadísticos, constituye la mejor manera de lograr el nivel de confianza requerido.

Estándares

1. El uso de sustancias químicas de alto grado de pureza es fundamental para asegurar la calidad de los datos analíticos en la cuantificación de los fármacos y/o de sus metabolitos.

2. Para tal fin y de acuerdo a las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP), se debe trabajar con estándares desarrollados por USP, BP, INAME o de otros organismos internacionales reconocidos. De igual manera, se pueden utilizar estándares secundarios o de trabajo siempre y cuando estén bien caracterizados de acuerdo a las BPF vigentes.

3. En el caso de los estándares de metabolitos (los que usualmente no se encuentran comercialmente disponibles) el centro debe demostrar, a través de certificados de análisis del proveedor o por ensayos realizados en el propio centro o laboratorios terceros, que éste presenta un grado de pureza definido y adecuado para ser utilizado como estándar de trabajo.

4. Las sustancias utilizadas como estándares internos deben cumplir los requisitos descriptos arriba para estándares de drogas o metabolitos, o bien presentar, por lo menos, un grado analítico p. a. o superior.

5. En todos los casos, los estándares deben ser trazables y contar con protocolos analíticos, así como ser almacenados conforme a las instrucciones del proveedor. Frecuentemente, éstos deben ser conservados en un lugar fresco, al abrigo de la luz, con baja humedad y siempre en frascos bien cerrados a los fines de resguardar su identidad durante todo el período de vida útil del mismo.

6. El centro debe contar con un procedimiento operativo estándar donde se describa la forma de conservación de los estándares y de qué manera se llevará un stock de los mismos, de forma tal de contar con estándares que se encuentren dentro del período de validez de los mismos.

Solventes y reactivos

7. Los solventes y reactivos utilizados en los ensayos no deben interferir con los resultados.

8. Se deben establecer procedimientos de control de proveedores de manera de asegurar que los solventes y reactivos adquiridos tengan la calidad adecuada para asegurar resultados confiables.

9. Asimismo, cuando corresponda, se debe solicitar, a los proveedores certificados analíticos de los insumos adquiridos y se mantendrán archivados y disponibles.

10. El laboratorio debe contar con una infraestructura tal que permita tanto el correcto almacenamiento de estos insumos como el manejo seguro en las áreas de trabajo a los fines de evitar posibles accidentes.

11. Los solventes y reactivos se deben rotular apropiadamente indicando, como mínimo: procedencia, identidad, lote, grado de pureza, período de validez (de ser aplicable) e instrucciones especificas del uso y almacenamiento. De no ser posible incorporar toda la información antes mencionada en un rótulo, ésta deberá consignarse en una planilla.

12. El centro debe contar con procedimientos escritos para la preparación y rotulado de las soluciones, como así también la forma de descarte de las mismas.

Agua

13 El agua utilizada en los ensayos debe ser de una calidad adecuada para el uso analítico, por lo que se deberá controlar mediante ensayos previamente protocolizados.

14. Esta podrá ser: deionizada, destilada, bidestilada, ultrapura.

15. En el caso que el centro cuente con un equipo productor de agua, debe redactar un procedimiento de manejo, mantenimiento y limpieza del mismo como así también de los ensayos a ser realizados en el agua y la frecuencia de realización de los ensayos.

Pipetas

16. El centro debe contar con procedimientos escritos para utilización, limpieza y conservación de las pipetas automáticas y toda verificación de la performance y calibraciones externas deben ser registradas y archivadas.

17. Los ensayos para determinar exactitud y precisión de las pipetas mecánicas de volumen fijo se deben realizar con masa de agua cada tres meses. Dicha operación debe registrarse.

18. En el caso de pipetas de volumen variable también se debe verificar y registrar la exactitud y la precisión usando una masa de agua por lo menos cada tres meses, en por lo menos tres puntos distintos (bajo, medio y alto).

Material de vidrio

19. La medida precisa del volumen es tan importante en muchos métodos analíticos como la medida de la masa. Por ello, es preciso considerar algunos puntos para la medición exacta de un determinado volumen, tales como verificación, calidad, correcto uso y mantenimiento de dichos materiales.

20. Se podrá verificar los volúmenes dispensados por estos materiales utilizados una masa de agua, y estos controles deberán ser documentados y archivados.

De ser necesario, el centro puede contar con materiales Clase A.

21. En todos los materiales de vidrio se debe mantener un grado de limpieza tal, que permitan el desplazamiento uniforme del líquido. Para ello, el centro debe contar con un procedimiento operativo escrito para la limpieza de estos materiales de vidrio.

Balanzas

22. Las balanzas analíticas deben ser instaladas en un local adecuado, niveladas, libre de corriente de aire, en mesadas exclusivas para las mismas y estables. Siempre que se pueda, deben estar dispuestas en ambientes con temperatura controlada.

23. Las balanzas deben ser acondicionadas después de su uso. Debe haber un programa que incluya el mantenimiento y la calibración periódica (como mínimo, anualmente) con toda la información registrada y archivada.

24. En el caso de balanzas electrónicas que no posean sistema de auto-calibración, la verificación debe ser hecha diariamente, antes de su utilización, con pesas certificadas.

25. El registro de verificación de las balanzas debe figurar como mínimo: fecha, datos de la verificación diaria (en el caso de que la balanza no cuente con auto-calibración), nombre del operador y datos de la pesada.

26. Todos los registros deben ser archivados y las pesas utilizadas en las verificaciones deben certificarse anualmente.

27. El centro debe contar con un procedimiento operativo con la información básica sobre el uso y funcionamiento de la balanza, limpieza, mantenimiento y calibración de la misma.

Freezers y refrigeradores

28. Las muestras biológicas de los estudios de bioequivalencia deben ser conservadas y almacenadas en freezers o refrigeradores destinados exclusivamente a tal fin y de acceso restringido.

29. Se debe controlar y registrar diariamente la temperatura de los freezers y refrigeradores. Se recomienda el uso de dispositivos de registro continuo de temperatura. El lugar más adecuado para colocar el termómetro es la parte central interna del equipo. Los instrumentos de medición deben ser calibrados en forma periódica.

30. En el caso de equipamientos que tengan registro automático de temperatura, estos deben permitir una verificación diaria de la temperatura y los datos, impresos o anotados, deberán ser archivados.

31. El centro debe contar con procedimientos escritos que describa la operatoria y frecuencia de limpieza y registro de temperatura.

pHímetro

32. El procedimiento para la utilización del aparato debe contener información básica sobre el uso, cuidados de mantenimiento, limpieza y almacenamiento de los electrodos.

33. La eficiencia de los electrodos debe ser verificada periódicamente. En cuanto a la calibración ésta debe ser realizada antes del uso usando al menos dos soluciones buffer, una con un pH por encima y otra debajo del valor que se pretende medir. Se debe registrar dichas calibraciones en el manual o planilla de uso del equipo.

Centrífugas

34. El centro debe contar con un procedimiento operativo para el correcto uso, limpieza y decontaminación de las centrifugas (balanceo, capacidad máxima).

35. Se debe registrar todo mantenimiento realizado en la centrífuga sea de rutina o no.

Cromatógrafo líquido y otros equipos destinados a la cuantificación

36. Todos los equipos deben contar con un programa escrito de mantenimiento y calibración periódica. Todo mantenimiento debe ser registrado y la documentación archivada.

37. Para el caso de las columnas cromatográficas éstas deben contar con planilla de uso donde se registre como mínimo las dimensiones, el tipo de relleno, el número de serie, las drogas analizadas y la cantidad de inyecciones realizadas en esa columna. De usarse una fase móvil con modificadores como agentes bloqueantes de silanoles (trietilamina u otras aminas orgánicas) de apareamiento iónico (alquilsulfonatos, alquilsulfatos, ácidos polifluorcarboxílicos, etc.), esta información también debe asentarse en dicha planilla.

Sistema de Extracción y/o Evaporación/concentración de muestras

38. El centro debe contar con procedimientos escritos que describa el correcto uso, limpieza y mantenimiento de rutina del equipo evaporador / concentrado, así como los equipos de vacío o presión positiva utilizados para extracción en fase sólida. Todo mantenimiento debe ser registrado y la documentación archivada.

39. Debe mantenerse una planilla de stock de columnas de extracción en fase sólida. Se debe demostrar mediante ensayos descriptos en protocolos la cantidad de veces que puede reutilizarse una misma columna de extracción en fase sólida.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

Bioseguridad

40. Todas las muestras biológicas deben considerarse como potencialmente peligrosas y/o infecciosas y deben manejarse de acuerdo a la norma vigente.

Transporte

41. Debe llevarse a cabo de acuerdo a un procedimiento escrito que cumpla la norma vigente. Deben registrarse las condiciones de transporte y correcta identificación.

Recepción

42. Debe realizarse de acuerdo a un procedimiento establecido, que incluya, número, integridad de contenedores, identificación, estado físico de las muestras y verificar que las mismas se encuentren en las condiciones acordadas con la unidad clínica. Así mismo, debe contener los criterios para rechazos de muestras.

43. A los fines de evitar confusiones y facilitar la trazabilidad de las muestras recibidas desde el centro clínico, las muestras deben ser asentadas en un Libro de Ingreso o planilla según disponga el respectivo procedimiento.

Almacenamiento

44. Debe asegurarse la identidad e integridad durante todo el período de estabilidad. En caso de fallas, debe existir un procedimiento escrito de contingencia que considere las acciones a seguir.

Descarte de las muestras

45. El centro debe contar con un procedimiento escrito sobre descontaminación de materiales y desecho de las muestras biológicas. Se debe archivar el comprobante de recolección y certificados de destrucción de los residuos líquidos y sólidos llevados a cabo por una empresa habilitada para tal fin.

MÉTODO BIOANALÍTICO

Introducción

46. Teniendo en cuenta que los estudios de bioequivalencia involucran voluntarios humanos, el centro analítico donde se cuantifiquen las muestras

biológicas, debe asegurar que el método bioanalítico ha sido debidamente validado de manera de obtener resultados confiables y consistentes.

47. La realización de una búsqueda bibliográfica es la primera etapa para encontrar un método bioanalítico. De encontrarse uno, este debe ser ensayado en cuanto a su reproducibilidad. De no hallarse un método adecuado, se debe desarrollar un método específico para la droga y/o metabolitos de interés.

48. En el desarrollo de un método es necesario verificar toda la metodología analítica, la que involucra, la preparación de la muestra con los procesos de extracción y/o separación, purificación, identificación y cuantificación de la droga en la matriz biológica.

49. Los parámetros fundamentales para la validación de un método bioanalítico son: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, linealidad, recuperación y estabilidad de corta y larga duración. El laboratorio debe contar con un procedimiento escrito que describa, de manera general, los pasos y ensayos que deben realizarse para validar un método

50. El procedimiento para validar un método particular junto con los criterios de evaluación de los ensayos debe estar descripto en un protocolo de validación.

51. En la validación, la matriz biológica utilizada debe ser la misma matriz objeto de estudio. De no disponer de la matriz de estudio se debe justificar el uso de otra matriz biológica.

52. El informe de resultados de la validación debe contener por lo menos: una descripción del método analítico, una descripción de los ensayos efectuados y los resultados más relevantes de los mismos, evidencia de la pureza e identidad de las sustancias estándar, las tablas de resultados de las mediciones y los cálculos efectuados con las mismas y la totalidad de los registros instrumentales de las mediciones (como cromatogramas o espectrogramas) en formato legible.

53. Los datos instrumentales en formato electrónico deben almacenarse correctamente para asegurar su integridad, de acuerdo a un procedimiento escrito establecido para tal fin.

Selectividad

54. La selectividad es la propiedad de un método bioanalítico para diferenciar y cuantificar una droga de interés en presencia de otros componentes de la muestra. Para la selectividad, se deben analizar muestras “blanco” de matriz biológica (plasma, orina u otra matriz) obtenidas de por lo menos, seis fuentes distintas. Cada muestra blanco debe ser ensayada de interferentes y se debe asegurar la selectividad comparando la respuesta del análisis con muestras en el límite de cuantificación. La respuesta de cualquier posible pico de interferencia debe ser no mayor al 20% y 5% a la del límite de cuantificación y del estándar interno respectivamente

55. Cuando se utiliza plasma como matriz biológica, se recomienda que se ensayen como mínimo cuatro plasmas normales y al menos un plasma lipémico y un plasma hemolizado.

Recuperación

56. La recuperación de una droga desde una matriz biológica es la cantidad de droga obtenida después de los procesos de purificación/extracción.

57. Los ensayos de recuperación deben ser realizados sobre muestras, de la misma matriz biológica de estudio, a las cuales se les agregan cantidades conocidas de la droga de interés en al menos tres concentraciones (baja, media y alta). Se someten a todos los procesos de extracción y/o purificación y luego se comparan los resultados analíticos de las muestras con soluciones patrón de la droga en las mismas concentraciones que alcanzan los analitos en el extracto analítico final, representando éstas últimas, el 100% de recuperación.

58. En el caso de utilizar estándar interno, debe ensayarse la recuperación del mismo. La recuperación indica la eficiencia de todos los procesos envueltos en el método analítico y debe ser tratada dentro de un límite de variabilidad.

59. La recuperación no necesita ser del 100%, pero la cantidad recuperada de droga y de estándar interno debe ser consistente y reproducible. Cuanto más próxima al 100 % sea la recuperación más efectivo es el método de purificación/extracción.

Exactitud

60. La exactitud de un método analítico describe el grado de concordancia entre los resultados obtenidos por el método en estudio y el valor de referencia esperado. La exactitud se debe determinar por el análisis de al menos tres concentraciones por quintuplicado: baja (entre el Límite Inferior de Cuantificación y 3 veces el LIC), media y alta (entre el 75% y 90% del Límite Superior de Cuantificación).

61. La concentración promedio observada debe estar comprendida en el rango 85% al 115% del valor teórico esperado, excepto para el límite de cuantificación, el cual debe estar en el rango 80% al 120%.

Precisión

62. La precisión de un método analítico describe la proximidad entre las diferentes medidas individuales de una droga. Se debe determinar la precisión intra e interdía con un mínimo de tres concentraciones (alta, media y baja) por quintuplicado.

63. El coeficiente de variación porcentual (CV%) de la precisión determinada a cada nivel de concentración no debe exceder el 15% entre los replicados, excepto para el límite de cuantificación donde el CV% no debe ser mayor del 20%.

Límite inferior de cuantificación

64. Es la mínima concentración de la droga que puede determinarse con precisión y exactitud definidas. El LIC es la menor concentración incluida en la curva de calibración.

La respuesta de la droga en el límite de cuantificación debe ser por lo menos cinco veces mayor que la respuesta del blanco.

65. La respuesta del analito debe ser discreta y reproducible con una precisión de 20% como CV% o mejor y una exactitud de entre el 80% y 120% respecto del valor de concentración nominal.

Calibración

66. Una curva de respuesta patrón es la relación entre la respuesta del instrumento y la concentración conocida de la droga. Se debe generar una curva de respuesta para cada analito de la muestra. Una cantidad suficiente de muestras replicadas deben ser usadas para definir adecuadamente la relación entre la concentración y la respuesta. La función de calibración debe seleccionarse sobre la base de los resultados obtenidos en la validación con métodos estadísticamente apropiados.

67. La función de calibración definida debe ser la misma en todas las secuencias analíticas, con el mismo método de ajuste y/o ponderación.

68. La curva de calibración debe ser preparada en la misma matriz biológica que las muestras ha analizarse, adicionando a la matriz concentraciones conocidas de la droga. El rango de concentraciones utilizado para la construcción de la curva de calibración debe ser función de los valores analíticos esperados en el estudio.

69. La curva de calibración debe consistir en una muestra “blanco” (muestra procesada sin estándar interno), una muestra cero (con estándar interno) y al menos seis muestras que cubran el rango de valores esperados incluido el límite inferior de cuantificación. Para respuestas no lineales se recomienda al menos 8 puntos de calibración incluyendo al límite inferior de cuantificación.

70. Los puntos de la curva no deben exceder en un +/- 15% el valor nominal de concentración y no más de un +/- 20% para el límite de cuantificación.

71. El valor máximo de concentración incluida en al calibración es el Límite Superior de Cuantificación (LSC). La capacidad de poder diluir muestras que originalmente tengan concentraciones superiores al LSC debe demostrarse en la validación por intermedio de los parámetros de precisión y exactitud, obtenidos a partir de, al menos, cinco muestras replicadas y analizadas en la misma secuencia analítica.

Estabilidad

72. La estabilidad de la droga en la matriz biológica es función de las condiciones de almacenamiento, propiedades químicas de la droga, de la matriz y del material de acondicionamiento o contenedor de la muestra.

La estabilidad de una droga en una matriz particular y en un material de acondicionamiento no puede ser extrapolada a otras matrices, materiales de acondicionamiento o condiciones de almacenamiento diferentes.

73. Las condiciones experimentales de los ensayos de estabilidad deben reflejar las situaciones a ser encontradas durante el manejo, almacenamiento y análisis de las muestras. También debe evaluarse la estabilidad de las soluciones patrón.

Ciclos de congelamiento – descongelamiento

74. La estabilidad del analito debe ser determinada después de por lo menos tres ciclos de congelado- descongelado, en un mínimo de tres alícuotas por cada concentración (baja y alta). Se debe conservar durante 24 horas a la temperatura de almacenamiento pretendida y descongelada a temperatura ambiente. Una vez descongelado totalmente, las muestras se deben re-congelar por 12 o 24 horas en las mismas condiciones. Los ciclos de congelamiento – descongelamiento deben ser

repetidos por tres veces y analizados en el tercer ciclo.

75. Si el analito es inestable a la temperatura de almacenamiento ensayada, se deberá analizar la estabilidad del mismo a – 70°C con tres ciclos de congelado- descongelado.

Estabilidad a corto plazo

76. Tres muestras de concentraciones alta y baja deben ser descongeladas a temperatura ambiente y mantenidas a esa temperatura durante 4 a 24 horas (basándose en el tiempo durante el cual las muestras a ser analizadas serán mantenidas a temperatura ambiente) y luego analizadas.

Condiciones de análisis

77. Se debe determinar la estabilidad de las muestras procesadas, incluyendo el tiempo de residencia en el automuestreador. Tres muestras de cada concentración (alta y baja) deben ser descongeladas a temperatura ambiente y mantenidas a la temperatura del ensayo durante el tiempo que lleve el análisis del total de las muestras de ese lote.

Estabilidad de la solución patrón

78. Debe ensayarse la estabilidad de la droga y del estándar interno durante todo el tiempo de análisis del lote de muestras, incluidas las posibles interrupciones.

79. La estabilidad de la solución patrón de la droga y del estándar interno debe ser ensayada por lo menos seis horas a temperatura ambiente y durante el tiempo de almacenamiento en freezer o refrigerador. Los resultados se deberán comparar con soluciones de reciente preparación.

Estabilidad a largo plazo

80. El tiempo de almacenamiento en el estudio de estabilidad a largo plazo debe exceder el tiempo de almacenamiento de las muestras del estudio de bioequivalencia, teniendo en cuenta el tiempo de almacenamiento de la primera muestra hasta el momento del análisis de la última muestra.

81. La estabilidad a largo plazo debe ser determinada en un mínimo de tres alícuotas de cada concentración (alta, media y baja) con las mismas condiciones de almacenamiento que las muestras de estudio. Los resultados deben ser comparados con las medidas obtenidas en muestras analizadas a tiempo cero del estudio de estabilidad a largo plazo.

ANEXO 6
BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE GASES MEDICINALES

PRINCIPIO - El presente anexo aborda la manufactura de gases medicinales, que es un tratamiento industrial especializado que no suelen realizar las empresas farmacéuticas. No cubre la fabricación y manipulación de los gases medicinales en hospitales. No obstante, las partes pertinentes de este anexo se podrán emplear como base para dichas actividades.

La fabricación de gases medicinales suele realizarse en equipo cerrado. Por consiguiente, la contaminación del producto por el entorno es mínima. Sin embargo, puede haber riesgo de contaminación cruzada con otros gases.

La fabricación de gases medicinales debe respetar las exigencias de las Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores / Exportadores de Medicamentos, junto con los Anexos aplicables, las normas de Farmacopeas y las siguientes directrices detalladas.

PERSONAL

1. El Responsable Técnico responsable de la liberación de los gases medicinales debe tener un conocimiento minucioso de la producción y el control de dichos gases.

2. Todo el personal que participe en la fabricación de los gases medicinales debe comprender las exigencias de las Buenas Prácticas de Fabricación aplicables a los Gases Medicinales y ser consciente de los aspectos de importancia crítica y de los riesgos potenciales para los pacientes que se derivan de los medicamentos en forma de gas.

INSTALACIONES Y EQUIPO

3 Instalaciones

3.1. Los gases medicinales se deben llenar en zonas separadas de los gases no medicinales y los recipientes de uso industrial no deben ser utilizados en el proceso de llenado de gases medicinales. No se debe producir ningún intercambio de recipientes entre ambas zonas.

No se permite usar los mismos recursos en la cadena de llenado de cilindros de gases medicinales y no medicinales. No obstante, en casos excepcionales, puede aceptarse el llenado de cilindros de gases medicinales y no medicinales, al mismo tiempo en la misma línea, aunque en zonas diferentes, siempre que el gas utilizado para fines no medicinales:

a) tenga la misma calidad o calidad superior que el gas medicinal.

b) se preparen los cilindros de acuerdo con los requisitos específicos que se fijan en esta norma.

c) exista una válvula antirretorno en la línea de suministro de la zona de llenado de gases no medicinales, para evitar posibles contaminaciones.

Asimismo, en casos excepcionales, se puede aceptar el principio de llenado por campaña en la misma zona, siempre que se tomen precauciones específicas y que se realice la validación necesaria.

3.2. Las instalaciones deben proporcionar espacio suficiente para las operaciones de producción, llenado, control y almacenamiento de forma que se evite el riesgo de mezcla o confusión. Las instalaciones deben estar limpias y ordenadas para favorecer el trabajo y el almacenamiento en condiciones adecuadas.

3.3. Las áreas de llenado deben tener un tamaño suficiente y una disposición adecuada que proporcionen:

a) zonas separadas, identificadas para los diferentes gases medicinales

b) identificación y segregación claras de los recipientes vacíos y los que se encuentran en distintas fases de procesamiento (p. ej. «en espera de llenado» y «lleno», «en cuarentena», «aprobado» y «rechazado»).

El método utilizado para conseguir estos diferentes niveles de segregación dependerá de la naturaleza, magnitud y complejidad de toda la operación en su conjunto, pero se podrán usar, con las debidas precauciones, marcas en el suelo, tabiques, separaciones, barreras, etiquetas y señales, u otros medios adecuados.

3.4. Para evitar la eventual contaminación por fisuras de cañerías, se deben realizar pruebas periódicas de estanqueidad en las líneas de abastecimiento.

4. Equipos

4.1. Todo el equipo de fabricación y análisis se debe calificar y calibrar a intervalos regulares adecuados.

4.2. Es necesario garantizar que se introduce el gas correcto en el recipiente adecuado.

No debe haber interconexiones entre conductos por los que circulen gases diferentes, excepto para procesos validados de llenado automatizado. Las conexiones de llenado deben corresponder

únicamente a la válvula del gas o de la mezcla de gases en particular, de forma que solamente puedan conectarse los recipientes correctos.

El uso de válvulas distribuidoras y de conexiones a la válvula del recipiente debe estar regulado por normativas nacionales. De no existir normativa nacional se aceptará normativa internacional reconocida.

La concordancia entre los diferentes gases o mezclas de gases y las válvulas de conexión constarán en un procedimiento escrito para cada planta de llenado, estando a disposición del personal que trabaje con ellos.

4.3. Las operaciones de mantenimiento y reparación no deben afectar a la calidad de los gases medicinales.

4.4. Debe evitarse el llenado de gases no medicinales en zonas y con equipos destinados a la producción de gases medicinales. Se pueden aceptar excepciones a esta regla, si el gas empleado para fines no medicinales tiene al menos la misma calidad que el gas medicinal, se cumplan las Buenas Prácticas de Fabricación, y

a) se preparan los envases de acuerdo con los requisitos específicos para recipientes medicinales

b) existe un método validado que impida el reflujo en la línea de suministro de la zona de llenado de gases no medicinales, a fin de evitar la contaminación del gas medicinal.

4.5. Los tanques de almacenamiento y las cisternas deben estar dedicados a un único gas con una calidad bien definida. No obstante, el gas medicinal líquido puede ser almacenado o transportado en los mismos tanques que el gas de la misma naturaleza no destinado a fines medicinales, siempre que este último sea al menos de la misma calidad que el gas medicinal y existan recursos que impidan la contaminación del gas al realizar las descargas.

4.6. En el caso que las cisternas deban ser usadas para el transporte de otro gas medicinal se debe realizar una purga de la cisterna con el nuevo gas hasta que los registros de análisis se encuentren dentro de las especificaciones, debiéndose incluir el análisis y especificaciones de contenido para el gas anterior.

DOCUMENTACIÓN

5 Los datos incluidos en los protocolos de cada lote de producto terminado, deben garantizar, que puedan seguirse todos los aspectos significativos de las operaciones de llenado correspondientes a cada recipiente. Según corresponda, debe indicarse lo siguiente:

a) denominación del producto;

b) fecha y hora de las operaciones de llenado;

c) referencia a la línea de llenado utilizada;

d) equipo utilizado;

e) denominación y referencia a la partida o lote y especificación del gas, o de cada gas de una mezcla;

f) operaciones efectuadas previas al llenado (ver el punto 8.5);

g) cantidad y tamaño de recipientes antes y después del llenado;

h) nombre de la persona que realiza la operación de llenado;

i) iniciales de los operarios en cada fase significativa (liberación de línea, recepción de envases, eliminación del contenido residual de los recipientes, etc.);

j) parámetros clave que son necesarios para garantizar el llenado correcto en condiciones normatizadas;

k) resultados de los ensayos de control de calidad y, si el equipo de ensayo se calibra antes de cada ensayo, especificación del gas de referencia y resultados de la comprobación de calibración;

l) resultados de las comprobaciones apropiadas para garantizar que los recipientes han sido llenados;

m) una muestra de la etiqueta de trazabilidad;

n) detalles sobre cualquier problema o evento no habitual y autorización firmada para cualquier desvío de las instrucciones de llenado;

o) para indicar el visto bueno, fecha y firma del supervisor responsable de la operación de llenado;

p) liberación o rechazo del lote firmada por el Responsable Técnico.

PRODUCCIÓN

6. Todos los procesos de fabricación deben ejecutarse de acuerdo a un procedimiento escrito y todas las fases críticas deben estar validadas.

7. Producción a granel

7.1. Los gases medicinales a granel se pueden preparar mediante síntesis química u obtener de recursos naturales aplicando, en caso necesario,

métodos de purificación (por ejemplo, en plantas de separación de aire) Estos gases se consideran graneles farmacéuticos.

7.2. Debe estar disponible la documentación que especifique la pureza, otros componentes y posibles impurezas en la materia prima y en las fases de purificación, según corresponda. Asimismo, deben estar disponibles diagramas de flujo de cada uno de los diferentes procesos.

7.3. Todas las etapas de separación y purificación deben estar diseñadas para su funcionamiento con un nivel óptimo de eficacia. Por ejemplo, las impurezas que puedan afectar negativamente a una etapa de purificación deben ser eliminadas antes de alcanzar dicha etapa.

7.4. Se debe validar la eficacia de las etapas de separación y purificación; estas etapas se deben controlar de conformidad con los resultados de la validación. En caso necesario, se debe controlar el proceso utilizando análisis continuos. El mantenimiento y la sustitución de los componentes fungibles del equipo, como los filtros de purificación, se debe basar en los resultados del control y la validación.

7.5. Cuando aplique, deben documentarse los límites de los diversos parámetros, por ejemplo temperaturas, presiones y caudales. El control de proceso incluirá la medición de estos parámetros.

7.6. Los sistemas informáticos utilizados para controlar o verificar los procesos deben estar validados.

7.7. En los procesos continuos, debe documentarse una definición de lote y relacionarse con el análisis del gas a granel.

7.8. La calidad y las impurezas deben controlarse continuamente durante la producción del gas.

7.9. Se debe controlar la calidad microbiológica del agua utilizada para el enfriamiento durante la compresión del aire cuando entre en contacto con el gas medicinal.

7.10. Todas las operaciones de transferencia de gases medicinales en estado líquido y gaseoso, incluidos los controles previos a la misma, a partir del almacenamiento inicial, deben realizarse de acuerdo con un procedimiento escrito diseñado para evitar cualquier contaminación. La línea de transferencia debe estar equipada con una válvula de retención u otra alternativa adecuada. Se debe prestar especial atención a la purga de las conexiones flexibles, las mangueras y los conectores.

7.11. Las remesas de gas pueden incorporarse a tanques de almacenamiento de producto a granel que contengan el mismo gas procedente de transferencias anteriores. Los resultados de una muestra deben mostrar que la calidad del gas que ingresa es aceptable. Esta muestra se tomará:

a) de la nueva remesa de gas antes de agregarla al tanque; o bien,

b) del tanque a granel después de la transferencia y homogeneizado.

7.12. Los gases medicinales a granel se deben definir como un lote, se controlarán de conformidad con las monografías pertinentes de la Farmacopea y se liberarán para el envasado.

8. Llenado y etiquetado

8.1. Para el llenado de gases medicinales, se debe definir el lote.

8.2. Los recipientes para gases medicinales deben cumplir las especificaciones técnicas que se indiquen en normas nacionales. De no existir norma nacional se aceptarán normas internacionales reconocidas. Las válvulas de salida de los envases deben estar dotadas de componentes que garanticen inviolabilidad hasta su utilización. Los cilindros tendrán preferiblemente válvulas de retención mínima a fin de ofrecer protección adecuada contra la contaminación.

8.3. Las válvulas distribuidoras para llenado de gases medicinales, así como los recipientes, deben estar dedicados a un único gas medicinal o a una determinada mezcla de gases medicinales (véase también el punto 4.2). Debe existir un sistema que garantice la trazabilidad de los recipientes y válvulas.

8.4. Para la limpieza y la purga del equipo de llenado y de los conductos, se deben seguir procedimientos escritos. Esto cobra especial importancia tras el mantenimiento o después de haberse roto la integridad del sistema. Se debe comprobar la ausencia de contaminantes antes de permitir el uso de la línea y se deben conservar protocolos de incidencias.

8.5. Los cilindros se deben someter a una inspección visual interna, cuando:

a) son nuevos

b) se les han realizado ensayos de revisión periódica, presión hidrostática o equivalentes.

Después de colocar la válvula, ésta debe mantenerse en la posición de cerrada para evitar la entrada de cualquier tipo de contaminación en el cilindro.

8.6. Antes del llenado se deben hacer las siguientes comprobaciones:

a) constatar la presión residual (>3 a 5 bar) para asegurarse de que el cilindro no se haya vaciado por completo

b) los cilindros sin presión residual deben ser apartados y se les deben aplicar medidas adicionales para garantizar que no están contaminados con agua u otras impurezas. Estas medidas deben incluir la inspección visual y la limpieza con métodos validados cuando esté justificada

c) ensayo de olor para asegurar ausencia de contaminación

d) prueba de martillo que indique ausencia de defectos en la pared del cilindro

e) comprobación de que se han eliminado todas las etiquetas de trazabilidad y otras

f) etiquetas si están dañadas

g) inspección visual externa de cada válvula y recipiente para descartar deformaciones, quemaduras, residuos, otros daños y contaminación con aceite o grasa. Los envases se deben limpiar, ensayar y mantener de la manera apropiada

h) verificación de cada conexión a la válvula del cilindro o recipiente criogénico para determinar si corresponde al gas medicinal de que se trate

i) comprobación de la «fecha de código de ensayo» del cilindro para verificar que el ensayo de presión hidrostática o equivalente se ha realizado y todavía es válido, como exigen las directrices nacionales. De no existir norma nacional se aceptarán normas internacionales reconocidas

j) comprobación de que cada recipiente lleva su código de color de acuerdo con la norma nacional y está correctamente pintado y rotulado

8.7. Los cilindros que se hayan devuelto para ser rellenados se deben preparar cuidadosamente para minimizar el riesgo de contaminación. En el caso de gases comprimidos, se debe obtener un nivel teórico máximo de impureza de 500 ppm v/v para una presión de llenado de 200 bar (y niveles equivalentes para otras presiones de llenado).

Para eliminar cualquier resto de gas de todos los cilindros, se podrán preparar de la siguiente manera:

a) venteo y evacuación del recipiente [al menos hasta una presión absoluta residual de 150 mbar] o bien,

b) venteo y purga mediante métodos validados (presurización parcial hasta un mínimo de 7 bar y después vaciado)

En el caso de cilindros equipados con válvulas de presión (positiva) residual, una evacuación al vacío a 150 mbar es suficiente, cuando la presión es positiva. Como alternativa, se puede hacer un análisis completo del gas remanente en cada recipiente.

Los recipientes criogénicos se prepararán al menos por venteo.

8.8. Se deben hacer controles apropiados para garantizar el llenado de los recipientes. Una indicación de que los cilindros se están llenando adecuadamente puede ser comprobar que su superficie exterior está caliente, al tocarlo ligeramente durante el llenado.

8.9. Cada recipiente debe llevar una etiqueta y un código de color. El número de lote y la fecha de llenado y la fecha de caducidad podrán indicarse en una segunda etiqueta, adherida al recipiente en forma firme, segura y en lugar bien visible.

CONTROL DE CALIDAD

9. El agua utilizada para el ensayo de presión hidrostática debe tener como mínimo la calidad de agua potable y se debe someter a análisis rutinarios fisicoquímicos y de contaminación microbiológica.

10. Cada gas medicinal se debe analizar y liberar de acuerdo con las especificaciones de la Farmacopea para garantizar su conformidad continua.

11. El gas a granel debe ser liberado para el llenado (véase el punto 7.12).

12. Si se trata de un solo gas medicinal envasado por medio de una válvula distribuidora múltiple, se debe realizar el control de calidad completo según la Farmacopea en al menos un cilindro del lote.

13. Si se trata de un solo gas medicinal envasado en cilindros uno a uno mediante operaciones de llenado individuales, se debe realizar el control de calidad completo según la Farmacopea en al menos un cilindro por cada ciclo ininterrumpido de llenado. Ejemplo de un ciclo ininterrumpido de operación de llenado es la producción de un turno de trabajo que utilice el mismo personal, equipo y lote de gas a granel.

14. Si se trata de un gas medicinal producido mediante la mezcla de dos o más gases diferentes en cilindros:

a) desde la misma válvula distribuidora, en al menos un cilindro del lote se debe identificar el gas balance de la mezcla y se deben analizar las impurezas pertinentes, y en todos los cilindros del lote se deben identificar y cuantificar los demás gases.

b) individualmente, en al menos un cilindro del lote se debe identificar el gas balance, y en cada uno de ellos se deben identificar y cuantificar los demás gases y las impurezas pertinentes.

15. Cuando se mezclen gases en línea antes del llenado (p. ej. óxido nitroso / oxígeno) se debe realizar un análisis continuo de la mezcla de llenado.

16. Cuando se llene un cilindro con más de un gas, el proceso de llenado debe garantizar que los gases están correctamente mezclados en cada cilindro y que la mezcla es totalmente homogénea.

17. Se debe controlar cada cilindro lleno utilizando un método adecuado a fin de descartar fugas antes de instalar el indicador de inviolabilidad. En el cilindro muestreado y analizado, la búsqueda de fugas se debe realizar después del análisis.

18. Si se trata de gas criogénico envasado en recipientes criogénicos para su entrega a pacientes domiciliarios o centros de salud, se debe realizar en cada el control de calidad según la Farmacopea y de funcionalidad.

19. Los recipientes criogénicos conservados por usuarios y rellenados con el gas medicinal *in situ* a partir de tanques móviles dedicados no estarán obligados a someterse a muestreo después del llenado, siempre que la operación de transferencia se realice utilizando un procedimiento validado, se encuentre asegurada la fidelidad del usuario a la empresa proveedora y la compañía que hace el llenado expida un certificado de análisis de una muestra tomada del tanque móvil. Los recipientes criogénicos que conservan los usuarios se deben analizar periódicamente para confirmar que su contenido cumple las exigencias de la Farmacopea. Cuando corresponda se realizará el control de funcionalidad.

20. No es necesario conservar muestras de archivo, a menos que se especifique lo contrario.

ALMACENAMIENTO Y LIBERACIÓN

21. Los recipientes llenos se deben mantener en cuarentena hasta que sean liberados por el Director Técnico.

22. Los recipientes llenos deben ser almacenados bajo techo y no deben ser sometidos a temperaturas extremas. Los depósitos deben ser apropiados al fin al que se destinan; deben estar limpios, secos, bien ventilados y sin materiales incompatibles, para garantizar que los recipientes permanecen limpios hasta el momento en que son expendidos.

23. Los depósitos se deben organizar de manera que permitan la separación de los distintos gases y de los recipientes llenos y vacíos, así como la rotación de las existencias respetando la expedición en el mismo orden que el ingreso.

24. Los recipientes llenos deben estar protegidos de condiciones atmosféricas adversas durante el transporte. Se deben aplicar condiciones específicas para el almacenamiento y transporte de cilindros que contienen mezclas de gas en las que se produzca separación de fases por congelación.

GLOSARIO

A continuación se incluyen las definiciones de términos relacionados con la fabricación de Gases Medicinales que no se ofrecen en el glosario de la Norma de Buenas Prácticas de Fabricación en vigor, pero que se utilizan en el presente Anexo.

Batería - Un conjunto de cilindros unidos en una misma estructura e interconectados por una válvula distribuidora, transportados y utilizados como si fueran una sola unidad.

Cilindro - Recipiente a presión, transportable, con capacidad no superior a 150 litros de agua. En el presente documento, el término cilindro incluye también baterías, según corresponda.

Cisterna - Recipiente fijado sobre un vehículo para el transporte de gas líquido o criogénico.

Ensayo de presión hidrostática - Ensayo realizado por motivos de seguridad tal como exigen las directrices nacionales para garantizar que los cilindros o tanques son aptos para soportar altas presiones.

Evacuar - Extraer el gas residual de un recipiente haciendo el vacío en su interior.

Gas - Sustancia o mezcla de sustancias completamente gaseosas a 1,013 bar (101,325 kPa) y +15 º C o cuya presión de vapor supere los 3 bar (300 kPa) a +50 º C (ISO 10286).

Gas a gr anel - Gas destinado a un uso medicinal que ha pasado por todas las fases de producción excepto el acondicionamiento final.

Gas comprimido - Gas que, cuando se acondiciona a presión, alcanza un estado completamente gaseoso a –50 º C (ISO 10286).

Gas criogénico - Gas que se transforma en líquido a 1,013 bar a temperaturas inferiores a –150 º C.

Gas líquido - Gas que, al ser acondicionado a presión, es parcialmente líquido (gas sobre un líquido) a –50 º C.

Gas medicinal - Gas o mezcla de gases destinado a su administración a pacientes con fines terapéuticos, diagnósticos o profilácticos con una acción farmacológica y clasificado como medicamento.

Impureza residual teórica máxima - Impureza gaseosa procedente de una posible retrocontaminación y que permanece tras el pretratamiento de los cilindros antes del llenado. El cálculo de la impureza teórica máxima solamente tiene importancia para los gases comprimidos y presupone que éstos actúan como gases perfectos.

Planta de separación de aire - Las plantas de separación de aire toman el aire atmosférico y, mediante procesos de purificación, limpieza, compresión, enfriamiento, licuefacción y destilación, lo separan en los gases oxígeno, nitrógeno y argón.

Purga - Vaciado y limpieza de un cilindro:

a) por venteo y evacuación, o bien

b) por venteo, presurización parcial con el gas de que se trate y nuevo venteo.

Recipiente - Recipientes criogénicos, tanques, cisternas, cilindros, baterías, o cualquier otro envase que esté en contacto directo con el gas medicinal.

Recipiente criogénico - Recipiente estático o móvil con aislamiento térmico diseñado para contener gases líquidos o criogénicos. El gas se extrae en forma gaseosa o líquida.

Tanque - Recipiente estático para el almacenamiento de gas líquido o criogénico.

Válvula - Dispositivo utilizado para abrir y cerrar recipientes a presión.

Válvula de retención - Válvula que permite el flujo únicamente en un sentido. También llamada Válvula Antirretorno.

Válvula de retención de presión mínima - Válvula provista de un sistema antirretorno que mantiene una presión definida (aproximadamente 3 a 5 bar por encima de la presión atmosférica) para impedir la contaminación durante el uso.

Válvula distribuidora - Equipo o aparato diseñado para permitir el vaciado y llenado simultáneo de uno o varios recipientes de gas. Incluye rampas, líneas, etc.

Venteo - Reducción de la presión hasta alcanzar la presión atmosférica.

Zona - Parte de las instalaciones dedicada específicamente a la fabricación de gases medicinales. También llamada Área.

ANEXO 7

BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE PRODUCTOS FITOTERÁPICOS

1. Consideraciones generales

1.1. Los lineamientos expuestos en este anexo están dirigidas a su aplicación en Productos Fitoterápicos.

1.2. Los elaboradores de Productos Fitoterápicos deberán ajustarse a estas prácticas y a las expuestas en el cuerpo principal de las Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores y Exportadores de Medicamentos.

1.3. Contrariamente a los productos farmacéuticos convencionales, que están fabricados generalmente a partir de materias primas sintéticas por medio de técnicas y procedimientos reproducibles de fabricación, los productos fitoterápicos están preparados a partir de material de origen vegetal que puede estar sujeto a contaminación y deterioro, de modo que estos pueden variar en su composición y características.

1.4. El control de las materias primas, el almacenamiento y el proceso de manufactura asume particular importancia debido a la naturaleza a menudo compleja y variable de muchos productos fitoterápicos, al número de principios activos y a la poca cantidad de ellos que se encuentran definidos. A tal efecto, debe aplicarse un adecuado sistema de aseguramiento de la calidad en la elaboración y el control de calidad de los productos fitoterápicos.

2. Calificación y validación

2.1. La calificación de equipamiento crítico, la validación de procesos y el control de cambios son particularmente importantes en la producción de medicamentos fitoterápicos, de los cuales a menudo no se conocen los constituyentes responsables de la actividad terapéutica. En este caso, la homogeneidad del proceso de producción asegura constancia de calidad, eficacia y seguridad lote a lote. Ver Anexo 15 *Validación y Calificación*.

3. Sanitización e higiene

3.1. Durante el cultivo, cosecha, recolección y procesado las materias primas son expuestas a un gran número de contaminantes, en especial microbiológicos. En relación a reducir esta exposición, es requisito que el personal encargado del manipuleo del material vegetal y productos fitoterápicos, tenga un alto grado de higiene personal así como también que haya recibido un entrenamiento adecuado acerca de los cuidados y responsabilidades referidas a la higiene.

3.2. El personal debe estar debidamente protegido del contacto con elementos tóxicos y materiales vegetales potencialmente alergénicos por medio de una indumentaria adecuada.

3.3. Se debe prestar especial atención a la limpieza y buen mantenimiento de las áreas de producción y depósito, particularmente cuando se genera polvo.

4. Personal y entrenamiento

4.1. El personal involucrado en el proceso de elaboración o en el control de calidad, debe estar bajo la autoridad de una persona entrenada y con la suficiente experiencia en el área especifica de proceso y control de calidad de materias primas y productos fitoterápicos. Lo mismo se aplica para la persona autorizada.

4.2. Con el fin de asegurar una alta calidad en los productos fitoterápicos, el personal debe tener un adecuado nivel de entrenamiento en áreas como botánica, fitoquímica y farmacognosia. Se llevarán registros del entrenamiento y periódicamente se evaluará la efectividad de los programas de entrenamiento realizados.

5. Autoinspecciones

5.1. El equipo de autoinspección debe consistir en personas expertas en sus campos. Al menos un miembro del equipo debe poseer particular experiencia en drogas vegetales y en los procesos que se realizan sobre las mismas en la producción de preparados de drogas vegetales y medicamentos fitoterápicos.

6. Reclamos y retiros de productos

6.1. La persona responsable del manejo de quejas y reclamos, debe poseer experiencia en áreas específicas de control de calidad de materiales vegetales y productos fitoterápicos. Debe tomarse especial atención para establecer si el reclamo fue causado por adulteración.

6.2. Los medicamentos fitoterápicos retirados del mercado deben ser segregados en un área segura, que cumpla los requerimientos especificados en el subtítulo “Áreas de depósito”, hasta que se decida su destino final mediante un procedimiento previamente escrito.

7. INSTALACIONES

Áreas de Depósito

7.1 Debido a que las materias primas de origen vegetal y los preparados de drogas vegetales son fácilmente degradables, atractivos para ciertos animales y sensibles a la contaminación microbiana, el correcto almacenamiento de los mismos asume especial importancia.

7.2 Las materias primas vegetales se deben almacenar en áreas separadas. El depósito debe estar bien ventilado y equipado de manera de proteger contra el ingreso de insectos y animales, especialmente roedores. Se deben tomar medidas eficaces para limitar la diseminación de microorganismos y/o insectos introducidos con las materias primas y para prevenir la contaminación cruzada.

7.3 Los envases se deben situar de tal manera que permitan la libre circulación de aire y faciliten la limpieza. A tal efecto los contenedores deben ser almacenados separados del suelo y separados entre sí con el fin de facilitar la limpieza e inspección.

7.4 Para minimizar el riesgo de contaminación, no debe existir contacto directo entre los materiales y las estanterías o pallets especialmente si estos son de madera.

7.5 El almacenamiento de plantas, extractos, tinturas y otras preparaciones de drogas vegetales puede requerir condiciones especiales de humedad y temperatura o protección contra la luz; debe asegurarse que estas condiciones son controladas y monitoreadas.

Áreas de Producción

7.6 Con el propósito de facilitar la limpieza y evitar la contaminación cruzada, deben tomarse precauciones especiales durante el muestreo, pesada, y procesos de producción. Se debe contar con instalaciones dedicadas y/o sistemas de extracción de polvo.

7.7 Los recipientes para desechos, claramente rotulados, deben permanecer tapados hasta su vaciado y lavado que se realizará diariamente.

Equipamiento

7.8 La limpieza del equipamiento utilizado en la producción de medicamentos fitoterápicos es particularmente importante dada la cantidad de polvo y material vegetal generados, lo cual puede crear condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos. La utilización de aspiradoras de polvo y limpieza húmeda son los métodos de elección. Por el contrario, el uso de aire comprimido y/o cepillado debe eliminarse como método de limpieza, debido a que estos incrementan el riesgo de contaminación.

7.9 Debe existir un área destinada para la limpieza y almacenamiento de los equipos y utensilios, separada de las áreas de producción.

7.10 Las partes de los equipos de producción que entran en contacto con el producto no deben ser reactivas, ni absorbentes, ni ceder ningún tipo de material, que pueda influir en la calidad del producto. Preferentemente, se utilizará equipamiento sin componentes de madera, con la finalidad de prevenir la contaminación.

8. DOCUMENTACIÓN

Especificaciones para Materias Primas

8.1 Solo puede ser alcanzada una consistente calidad en los productos fitoterápicos, si las especificaciones de las materias primas son definidas de manera rigurosa y detallada. Por esta razón, además de lo descripto en Guía general de Buenas Prácticas de Fabricación y Control, las especificaciones para las materias primas deben incluir lo siguiente:

- Nombre botánico (si es apropiado, el nombre de autores de la clasificación).
- Detalles del origen de la planta (país de origen, y si es aplicable métodos de cultivo, época de cosecha, procedimientos de recolección, cantidad de pesticidas utilizados y fecha, etc.)
- Describir si se utiliza la planta entera o que parte/s de ella.
- Si la materia prima adquirida es desecada, el método de secado debe estar especificado.
- Descripción de la materia prima basado en la inspección macroscópica y microscópica.
- La identificación de la materia prima, que debe incluir, cuando sea apropiado, la identificación de los componentes activos o de los marcadores conocidos. A los fines de identificación puede ser utilizado un ejemplar autentico de la especie a analizar.
- Valoración de componentes con actividad terapéutica conocida o marcadores. Deben especificarse los límites de aceptación.
- Determinación de posible contaminación con pesticidas y límites aceptables para tal contaminación.
- Resultados de análisis para la determinación de metales pesados y posibles contaminantes,

especificando los límites de aceptación, como también materiales extraños y adulteraciones.

- Resultados de análisis para contaminación microbiana, incluyendo micotoxinas, y
- Otros análisis (tamaño de partícula, índice de hinchamiento, solventes residuales en preparados de drogas vegetales, etc.).

8.2 Cualquier tratamiento utilizado para reducir la contaminación microbiana o la eliminación de insectos debe ser documentado. Se debe incluir en la documentación detalles del proceso, de los análisis para determinar el grado de contaminación y de los límites aceptados para los residuos.

8.3 La expresión cualitativa y cuantitativa de las sustancias activas en las materias primas y en las preparaciones debe realizarse de las siguientes maneras:

8.3.1 Materia Prima:

(a) debe ser indicada la cantidad de droga vegetal; o

(b) la cantidad de droga vegetal se puede expresar como un rango, correspondiendo a una cantidad definida de componentes con actividad terapéutica conocida.

Ejemplo:

Nombre del Ingrediente activo: Hojas de Sen.

Cantidad: (a) 900 mg.; o (b) 830-1000 mg, correspondiendo a 25 mg de glucósidos hidroxiantracénicos calculados como Senósido B.

8.3.2. Preparaciones de drogas vegetales

(a) debe ser indicada la cantidad equivalente o el cociente entre la cantidad de droga vegetal y la preparación (esto no se aplica a los aceites esenciales o fijos) o,

(b) la cantidad de preparación se puede expresar como un rango, correspondiendo a una cantidad definida de componentes con actividad terapéutica conocida. Ver ejemplo en 8.5.1.

8.4 Debe indicarse la composición de cualquier solvente o mezcla de solventes utilizados, como también el estado físico del extracto.

8.5 Si cualquier otra sustancia o mezcla de sustancias son agregadas durante el proceso de fabricación de la preparación, estas deben estar descriptas como “otros ingredientes”.

8.5.1 Ejemplo:

Nombre del principio activo: Hojas de Sen.

contaminación radiactiva (en especial para materias primas que han sido irradiadas). Deben especificarse los límites de aceptación.

Cantidad: (a) 125 mg de extracto etanólico seco (8:1) o 125 mg de extracto etanolico, equivalente a 1000 mg de Hojas de Sen; o (b) 100-130 mg de extracto etanólico (8:1), correspondiendo a mg de glucósidos hidroxiantracénicos, calculados como Senósido B.

Otros ingredientes: Dextrina 20-50 mg.

Especificaciones para Productos Terminados

8.6 Los análisis de control de calidad y las especificaciones de producto terminado deben ser tales que permitan la determinación cualitativa y cuantitativa de los ingredientes activos. Si se conoce la actividad terapéutica de los componentes, estos deben especificarse y determinarse cuantitativamente. Cuando esto no es posible, las especificaciones deben estar basadas en la determinación de marcadores.

8.7 Si el producto terminado o las preparaciones contienen varias materias primas, y la determinación de los componentes activos individuales no es posible, puede ser determinado el contenido combinado de varios componentes activos. Debe justificarse la necesidad de tal procedimiento.

8.8 Las especificaciones para productos terminados deben incluir lo siguiente:

- Contaminación microbiana y de metales pesados.
- Uniformidad de peso, desintegración, dureza, friabilidad (para comprimidos y cápsulas), viscosidad (para fluidos).
- Humedad (en caso de formas farmacéuticas sólidas).
- Características organolépticas.
- Identificación.
- Valoración de componentes activos o marcadores.
- Impurezas provenientes de degradación (identificadas o no, si es apropiado).

8.9 Las instrucciones de proceso deben enumerar las operaciones que se realizarán sobre las materias primas, tales como secado, molienda, tamizado, etc. incluyendo el control de parámetros críticos como pueden ser temperatura, y métodos

para controlar el tamaño de fragmentos o partículas, entre otros.

8.10 Las instrucciones de procedimientos utilizados para disminuir la contaminación microbiana o la eliminación de insectos en las materias primas deben estar disponibles. Las mismas deben incluir los detalles del proceso junto con métodos para determinar los residuos de los agentes utilizados con sus límites de aceptación.

9. PRODUCCIÓN

9.1. Lotes de materias primas provenientes de diferentes zonas geográficas pueden ser mezclados siempre y cuando se demuestre que la mezcla será homogénea microscópicamente, macroscópicamente y químicamente, entre otras. Este procedimiento debe estar documentado.

9.2. Todos los lotes deben estar previamente aprobados por control de calidad. Los lotes que se encuentran fuera de especificación no pueden ser mezclados con otros.

10. CONTROL DE CALIDAD

10.1. El personal dedicado a esta actividad debe tener particular experiencia en productos de origen vegetal para llevar a cabo los análisis de identificación y el reconocimiento de presencia fúngica, de heterogeneidad, y de adulteraciones, etc. sobre las materias primas.

Muestras de Referencia y Estándares

10.2 En el caso de productos fitoterápicos, un estándar de referencia puede ser un ejemplo botánico de una planta, una muestra de una preparación de una droga vegetal (ej. Extracto conocido), una sustancia químicamente definida, un constituyente con actividad terapéutica conocida, sustancias marcadores o impurezas conocidas.

10.3 El laboratorio de control de calidad debe poseer ejemplares auténticos de las especies vegetales, utilizadas en la elaboración, con el fin de realizar pruebas comparativas. Es importante, que se cuente con ejemplares utilizados generalmente en las adulteraciones, ya que en ocasiones, la molienda y el mezclado reducen considerablemente la probabilidad de reconocimiento de las mismas.

10.4 Si el medicamento fitoterápico no está descripto en una farmacopea, puede ser utilizada una muestra de herbario estandarizada de varias plantas enteras o partes de ella.

Muestreo

10.5 Debido al hecho de que las materias primas son, en general, agregados de plantas individuales y por tal motivo la heterogeneidad es considerablemente alta, el muestreo estadístico debe ser llevado a cabo por una persona particularmente experimentada. Cada contenedor debe ser identificado por su propia documentación.

Estudios de Estabilidad

10.6 No será suficiente determinar la estabilidad de los componentes con actividad terapéutica conocida o los marcadores, puesto que las materias primas de origen vegetal o las preparaciones de drogas vegetales se miran en su totalidad como un principio activo. Por lo tanto, debe demostrarse lo más acertadamente posible (ej. Por comparación de perfiles cromatográficos) que las otras sustancias presentes son estables y que su contenido como proporción del conjunto sigue siendo constante. Es importante la observación de las características organolépticas y físicas de las muestras a analizar ya que pueden ser modificadas por la presencia o ausencia de diversas sustancias que se encuentran por debajo de los límites de detección.

10.7 En los productos compuestos por varias materias primas, y cuando no es posible determinar la estabilidad de cada componente en forma individual, esta podrá ser determinada mediante la comparación de perfiles cromatográficos, métodos de valoración, y otros ensayos fisicoquímicos.

GLOSARIO

Constituyentes con Actividad Terapéutica Conocida - Sustancias o grupos de sustancias químicamente definidas de las cuales se conoce que son responsables o contribuyen a la actividad terapéutica de preparados de drogas vegetales o productos Fitoterápicos.

Droga Vegetal - Plantas enteras o sus partes, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos, cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, resinas, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos fitoterápicos.

Materia Prima - Droga vegetal o su preparación, con o sin actividad terapéutica, empleada en la fabricación de medicamentos fitoterápicos, excluyendo los materiales de envase.

Marcador - Constituyente químicamente definido de la droga vegetal, con o sin actividad terapéutica, de interés para propósitos de control, que puede servir para calcular la cantidad de droga vegetal o de sus preparaciones en el producto final. Estos deben determinarse cuantitativamente en las materias primas.

Medicamentos Fitoterápicos - Los medicamentos definidos de acuerdo con el Artículo 1º inciso a) del Decreto Nº 150/92, pero que no reúnen los requisitos establecidos para las especialidades medicinales o farmacéuticas definidas en el inciso d) del Artículo 1º de dicha norma, y que contengan como principio activo drogas vegetales puras y/o mezclas definidas de éstas y/o preparados de drogas vegetales, tradicionalmente usadas con fines medicinales y que no contengan sustancias activas químicamente definidas o sus mezclas aun cuando fuesen constituyentes aislados de plantas, salvo en los casos que así se justifiquen.

Nombre Científico - Nombre en latín actualizado de una droga vegetal que permite ubicarla taxonomicamente según normas internacionales reconocidas. Debe incluir Género, especie y autor. Cuando corresponda debe incluir Familia y taxa menores.

Preparados de Drogas Vegetales - Productos obtenidos a partir de drogas vegetales (tinturas, extractos, digeridos, pulverizados u otros) donde se involucren procedimientos tales como extracción, destilación, purificación, secado, etc. Cada preparado se considerará en su totalidad como un principio activo. Los jugos, resinas, gomas, látex, aceites esenciales o fijos serán considerados como drogas vegetales de acuerdo al la definición (Art. 2° de la Resolución 144/98). Se excluyen de esta definición a los constituyentes aislados químicamente definidos.

ANEXO 8

MUESTREO DE MATERIALES DE PARTIDA Y DE ACONDICIONAMIENTO

PRINCIPIO - El muestreo es una operación importante en la que sólo se toma una pequeña fracción de un lote. No pueden obtenerse conclusiones válidas basándose únicamente en ensayos que se han realizado en muestras no representativas. Por lo tanto, el muestreo constituye una parte esencial del sistema de Aseguramiento de la Calidad.

NOTA: el muestreo se trata en el Capítulo 6 de la Norma de BPF (ítem 6.11 a 6.14). Este Anexo complementario proporciona indicaciones adicionales a la Norma sobre el muestreo de los materiales de partida y los de acondicionamiento.

PERSONAL

1. El personal que toma muestras debe recibir capacitación inicial y continua en las disciplinas pertinentes a la correcta toma de muestras. Dicha capacitación debe incluir:

a) planes de muestreo,

b) procedimientos escritos de muestreo,

c) técnicas y equipamiento para el muestreo,

d) los riesgos de contaminación cruzada,

e) las precauciones a tomarse con respecto a sustancias inestables y/o estériles,

f) la importancia de la evaluación del aspecto visual de los materiales, envases y rótulos,

g) la importancia de registrar cualquier circunstancia inesperada o inusual.

MATERIALES DE PARTIDA

2. Normalmente, sólo puede asegurarse la identidad de un lote completo de material de partida si se toman muestras individuales de todos los envases y se realiza un ensayo de identidad en cada muestra. Se permite tomar muestras sólo de una proporción de los envases en los casos en que se haya establecido un procedimiento validado para asegurar que ningún envase aislado de material de partida sea identificado incorrectamente en su rótulo.

3. Dicha validación debe tener en cuenta al menos los siguientes aspectos:

a) naturaleza y calificación del elaborador, del proveedor y del transporte y su conocimiento de los requerimientos de BPF de la industria farmacéutica;

b) el sistema de aseguramiento de la calidad del fabricante del material de partida;

c) las condiciones de fabricación en las que se producen y controlan los materiales de partida;

d) la naturaleza del material de partida y del medicamento en el que se lo utilizará.

Bajo estas premisas, es posible que pueda aceptarse un procedimiento validado que exima del ensayo de identidad de cada envase entrante de materia prima en los siguientes casos:

e) materiales de partida que provienen de un elaborador o planta mono producto

f) materiales de partida que provienen directamente del elaborador y en envase sellado de un fabricante del que existe un historial de cumplimiento y a quien el comprador (el elaborador del medicamento) le realiza auditorias regulares al sistema de Aseguramiento de Calidad

Es improbable que un procedimiento pueda ser satisfactoriamente validado en el caso de:

g) materiales de partida suministrados por intermediarios, como ser agentes de venta (brokers), donde el origen de elaboración es desconocido o no auditado por el elaborador del medicamento

h) materiales de partida destinados a ser utilizados en productos parenterales

4. Puede evaluarse la calidad de un lote de material de partida tomando y ensayando una muestra representativa. A tales efectos pueden utilizarse las muestras tomadas para el ensayo de identidad. El número de muestras tomadas para la preparación de una muestra representativa se debe determinar estadísticamente y especificar en un plan de muestreo. También debe definirse el número de muestras individuales que pueden mezclarse para conformar una muestra compuesta teniendo en cuenta: la naturaleza del material, el conocimiento del proveedor y la homogeneidad de la muestra compuesta.

MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO

5. El plan de muestreo de los materiales de acondicionamiento debe tener en cuenta al menos los siguientes puntos: la cantidad recibida, la calidad requerida, la naturaleza del material (por ej., materiales de acondicionamiento primario y/o materiales impresos), los métodos de producción y el conocimiento del sistema de Aseguramiento de la Calidad del fabricante de los materiales de acondicionamiento basado en auditorias.

Debe determinarse estadísticamente el número de muestras a tomar el cual deberá especificarse en un plan de muestreo.

ANEXO 9

ELABORACIÓN DE LÍQUIDOS Y SEMISÓLIDOS

PRINCIPIO - Los líquidos y los semisólidos (cremas, pomadas, ungüentos, entre otros) pueden ser particularmente susceptibles tanto a la contaminación microbiana como de otros tipos durante la elaboración. Por ello, deben adoptarse medidas especiales para evitar cualquier tipo de contaminación.

NOTA: la elaboración de líquidos y semisólidos debe realizarse de acuerdo con la Norma de BPF descripta y cuando corresponda con las otras normativas complementarias. El presente Anexo sólo enfatiza puntos específicos para la elaboración de este tipo de formas farmacéuticas.

LOCALES Y EQUIPAMIENTO

1. Se recomienda el uso de sistemas cerrados de procesamiento y de transferencia a fin de proteger el producto de la contaminación. Las áreas de producción en las que se encuentran expuestos los productos o envases limpios abiertos deben ser efectivamente ventiladas con aire filtrado.

2. Los tanques, contenedores, tuberías y bombas deben diseñarse e instalarse de manera tal que puedan limpiarse fácilmente y de ser necesario, sanitizarse. El diseño del equipamiento debe minimizar, en particular, la cantidad de puntos muertos o sitios en donde puedan acumularse residuos y permitir el desarrollo microbiano.

3. De ser posible, el uso de equipos de vidrio debe evitarse. El acero inoxidable de alta calidad debe ser el material de preferentemente elegido para aquellas partes que están en contacto con el producto, en la medida que el producto no se vea afectado.

PRODUCCIÓN

4. Debe especificarse y controlarse/monitorearse la calidad química y microbiológica del agua utilizada en producción. Se debe tener cuidado en el mantenimiento de los sistemas de agua a los efectos de evitar el riesgo de desarrollo microbiano. Después de una sanitización química de los sistemas de agua, debe implementarse un procedimiento de enjuague validado a fin de asegurar que el agente sanitizante ha sido eliminado de manera efectiva.

5. Debe verificarse la calidad de los materiales recibidos en tanques a granel antes de transferirlos a los tanques de almacenamiento.

6. Debe tomarse precauciones cuando se transfieran materiales a través de tuberías a fin de garantizar que llegan al destino correcto.

7. Los materiales que puedan desprender fibras u otros contaminantes, como el cartón o las tarimas de madera no deben ingresar a las áreas en las que existan productos o recipientes limpios expuestos.

8. Durante el llenado deben tomarse recaudos para mantener la homogeneidad de mezclas, suspensiones, entre otros. Los procesos de mezcla y llenado deben validarse. Debe prestarse especial atención al inicio de un proceso de llenado, después de interrupciones y al final del proceso, a fin de asegurar la homogeneidad del producto.

9. Cuando un producto terminado no es inmediatamente acondicionado debe especificarse y respetarse el período máximo de almacenamiento así como las condiciones del mismo.

ANEXO 10

ELABORACION DE MEDICAMENTOS PARA INHALACIÓN EN AEROSOL PRESURIZADO CON DOSIFICADOR

PRINCIPIO - La elaboración de medicamentos para inhalación en aerosoles presurizados con válvulas dosificadoras requiere de ciertos recaudos especiales dada la particular naturaleza de esta forma farmacéutica. Debe desarrollarse bajo condiciones que minimicen la contaminación microbiana y por partículas. Es de vital importancia asegurar la calidad de los componentes de las válvulas y en el caso de suspensiones también es esencial la uniformidad.

NOTA: la elaboración de aerosoles debe realizarse de acuerdo con la Norma de BPF descripta y cuando corresponda con las otras normativas complementarias. El presente Anexo sólo enfatiza puntos específicos para la elaboración de este tipo de formas farmacéuticas.

CONSIDERACIONES GENERALES

1. En la actualidad existen dos métodos comunes de elaboración y llenado, a saber:

a) sistema de dos disparos (llenado a presión): el ingrediente activo es suspendido en un propelente de alto punto de ebullición, la dosis se llena en el envase, se engrampa la válvula y a través del vástago de la válvula se inyecta el propelente de punto de ebullición más bajo para conformar el producto terminado. La suspensión del ingrediente activo en el propelente se mantiene fría para reducir la pérdida por evaporación.

b) proceso de un disparo (llenado en frío): el principio activo se suspende en una mezcla de propelentes y se mantiene a alta presión y/o a baja temperatura. Luego, se llena el envase directamente con la suspensión en un disparo.

LOCALES Y EQUIPAMIENTO

2. La elaboración y el llenado deben realizarse, en la medida de lo posible, en un sistema cerrado.

3. En los casos en donde haya exposición de productos o envases y sus accesorios limpios, el área debe contar con aire filtrado, cumpliendo con los requisitos de un ambiente de al menos Grado D e ingreso a través de esclusas.

PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

4. Las válvulas dosificadoras para aerosoles constituyen una pieza de ingeniería más compleja que la mayor parte de los componentes farmacéuticos. Las especificaciones, el muestreo y los ensayos de control deben ser apropiados para este fin. Es de especial importancia auditar el sistema de Aseguramiento de la Calidad del fabricante de las válvulas.

5. Todos los fluidos (por ej. propelentes líquidos o gaseosos) deben filtrarse para eliminar las partículas mayores a 0,2 micrones. De ser posible, debe realizarse la filtración inmediatamente antes del llenado.

6. Los envases y las válvulas deben limpiarse utilizando un procedimiento validado apropiado al uso del producto a fin de asegurar la ausencia de cualquier contaminante como adyuvantes de fabricación (por ej. lubricantes) o contaminantes microbiológicos indebidos. Después de la limpieza las válvulas deben conservarse en recipientes limpios y cerrados y deben tomarse precauciones para no introducir contaminación en el manipuleo posterior, por ej. en la toma de muestras. Los envases deben llegar limpios a la línea de llenado, o bien limpiarse en línea inmediatamente antes del llenado.

7. Deben tomarse precauciones para asegurar la uniformidad de las suspensiones en el punto del llenado y durante todo el proceso de llenado.

8. Cuando se emplea un proceso de llenado de dos disparos, es necesario asegurar que ambos disparos sean del peso adecuado a fin de lograr la composición correcta. Para este propósito, es aconsejable la verificación del 100 % del peso en cada etapa.

9. Debe asegurarse la ausencia de pérdidas indebidas (fugas) mediante controles posteriores al llenado. Cualquier ensayo para detectar pérdidas debe realizarse de tal manera que evite la contaminación microbiana o la humedad residual.

ANEXO 11
SISTEMAS INFORMÁTICOS

PRINCIPIO - La incorporación de sistemas informáticos dentro de los sistemas de elaboración, incluyendo el almacenamiento, la distribución y el control de calidad no altera la necesidad de observar los principios fundamentales establecidos en otras partes de la normativa. En los casos en que un sistema informático reemplaza una operación manual, no se debe producir una disminución en la calidad del producto o en el aseguramiento de la calidad. Se debe tener en cuenta el riesgo de perder aspectos del sistema anterior al reducir la participación humana.

PERSONAL

1. Es esencial que exista una estrecha cooperación entre el personal responsable y el personal relacionado con los sistemas informáticos. Las personas que ocupen puestos de responsabilidad deben contar con la capacitación adecuada para gestionar y usar sistemas que utilizan computadoras, dentro de su campo de responsabilidad. Esto debe incluir la garantía de que se dispone de una experiencia adecuada y de que se utiliza esta experiencia para aconsejar en aspectos de diseño, validación, instalación y operación del sistema informático.

VALIDACIÓN

2. El alcance de la validación necesaria dependerá de cierto número de factores entre los que se puede señalar el uso al que vaya a destinarse el sistema, si la validación es prospectiva o retrospectiva, y si se incorporan o no nuevos elementos. Se debe considerar la validación como parte del ciclo completo de vida de un sistema informático. Este ciclo comprende las etapas de planificación, especificación, programación, ensayo, puesta en marcha, documentación, operación, monitoreo y cambios.

SISTEMA

3. Se debe prestar atención a la ubicación del equipamiento en condiciones adecuadas, en las que no puedan interferir con el sistema factores extraños.

4. Se debe elaborar y mantener actualizada una descripción por escrito detallada del sistema (incluyendo diagramas según corresponda). Se deben describir los principios, objetivos, medidas de seguridad y alcance del sistema y los rasgos principales sobre la forma que se utiliza la computadora y de la interacción de éste con otros sistemas y procedimientos.

5. El conjunto de programas (software) es un componente crítico de un sistema informático. El usuario de tales programas debe tomar todas las medidas razonables para garantizar que han sido elaborados de acuerdo con el sistema de Aseguramiento de la Calidad.

6. Cuando corresponda, el sistema debe incluir una verificación automática de la entrada y tratamiento correcto de los datos.

7. Antes de comenzar a utilizar un sistema que utilice una computadora, se debe comprobar detalladamente y confirmar que es capaz de conseguir los resultados deseados. Si va a sustituir a un sistema manual, ambos deben funcionar en paralelo durante algún tiempo, como parte de su ensayo y validación.

8. Los datos deben ser ingresados o modificados sólo por personas autorizadas para hacerlo. Entre los métodos adecuados para evitar la introducción no autorizada de datos se incluye la utilización de claves, tarjetas codificadas, códigos personales y acceso restringido a las computadoras terminales. Debe establecerse un procedimiento definido para la emisión, cancelación y modificación de la autorización para introducir y modificar datos, incluyendo el cambio de contraseñas personales. Se deben considerar sistemas que permitan el registro de intentos de acceso por personas no autorizadas.

9. Cuando se ingresan datos críticos manualmente (por ejemplo el peso y el número de lote de una materia prima durante la dispensación), debe verificarse de manera adicional la exactitud del registro que se está realizando. Dicha verificación puede efectuarse por un segundo operador o un medio electrónico validado.

10. El sistema debe registrar la identidad de los operadores que ingresen o confirmen datos críticos. La capacidad para modificar datos críticos debe restringirse a personas designadas. Cualquier alteración de un registro de datos críticos debe estar autorizada y debe registrarse junto con el motivo del cambio. Se debe considerar que el sistema cree un registro completo de todas las entradas y modificaciones (“registro de auditoría”).

11. Las alteraciones en un sistema o programa informático se deben realizar—únicamente, de acuerdo con un procedimiento definido**,** que debe

incluir la posibilidad de validar, controlar, aprobar e implementar el cambio. Esta alteración sólo se debe llevar a cabo con el consentimiento previo de la persona responsable de la parte del sistema en cuestión y se debe registrar dicha alteración. Cualquier modificación significativa debe validarse.

12. A los efectos de auditar la calidad, debe ser posible obtener copias impresas fieles de los datos almacenados electrónicamente.

13. Los datos se deben proteger por medios físicos o electrónicos contra daños intencionales o accidentales, de acuerdo con el ítem 4.9 del Capítulo 1 de la presente Normativa. Se debe verificar que los datos almacenados sean accesibles, duraderos y exactos. Si se proponen cambios en los equipos de computación o sus programas, se deben implementar las verificaciones antes mencionadas con una frecuencia adecuada para el medio de almacenamiento que se utilice.

14. Se deben proteger los datos mediante una copia de seguridad ("back-up") a intervalos regulares. Los datos resultantes deben almacenarse tanto tiempo como sea necesario en un lugar separado y seguro.

15. Debe disponerse de soluciones alternativas apropiadas para los sistemas que necesiten ser operados en caso de avería. El tiempo necesario para poner en marcha el sistema alternativo debe estar relacionado con la posible urgencia con que sea necesario utilizarlo. Por ejemplo, la información necesaria para efectuar un retiro, debe estar disponible lo antes posible.

16. Se deben definir y validar los procedimientos a seguir, en caso de falla o interrupción del sistema. Se debe registrar cualquier falla y las acciones correctivas tomadas en consecuencia.

17. Se debe establecer un procedimiento para registrar y analizar los errores y para permitir que se tomen las acciones correctivas.

18. En caso de contratar empresas externas para proporcionar un servicio informático, debe existir un acuerdo formal que incluya una delimitación clara de responsabilidad de dichas empresas (ver Capítulo 7).

19. Cuando la liberación de un lote para la venta o distribución se realiza mediante un sistema informático, el sistema debe ser capaz de reconocer que sólo la persona autorizada puede liberar los lotes y debe identificar y registrar claramente a la persona que los libera.

ANEXO 12

USO DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LA ELABORACIÓN DE MEDICAMENTOS

PRINCIPIO - La radiación ionizante puede utilizarse en el proceso de elaboración con diferentes finalidades, incluyendo la reducción de la carga microbiológica y esterilización de materiales de partida, de acondicionamiento o productos y el tratamiento de hemoderivados.

Si la Autoridad Sanitaria no ha aprobado, para el producto terminado, el tratamiento de radiación ionizante, el mismo no puede utilizarse para subsanar deficiencias de BPF en las etapas de producción.

Existen dos tipos de procesos de irradiación: irradiación Gamma mediante una fuente radiactiva e irradiación con Electrones de alta energía (radiación Beta) mediante un acelerador.

Irradiación Gamma - Se pueden emplear dos modos de procesamiento diferentes:

(i) Modo por lote: se disponen los productos en puntos fijos alrededor de la fuente de radiación. Mientras se los expone no se pueden realizar actividades de carga o descarga.

(ii) Modo continuo: un sistema automático transporta los productos a la celda de radiación, los hace atravesar la fuente de radiación expuesta con una trayectoria definida y a una velocidad adecuada y luego los extrae de la celda.

Irradiación de electrones - Los productos son transportados pasando por un haz, continuo o por pulsos de electrones de alta energía (radiación Beta). El haz, con movimientos oscilantes hacia delante y atrás, impacta sobre el material a su paso.

RESPONSABILIDADES

1. El tratamiento mediante irradiación lo puede llevar a cabo el elaborador farmacéutico o un operador de una instalación de radiación contratada (“elaborador contratado”), para lo que ambos deben poseer la habilitación de elaboración correspondiente.

2. El elaborador farmacéutico tiene la responsabilidad de la calidad del producto incluyendo el logro del objetivo de la irradiación. El operador contratado de la instalación de irradiación tiene la responsabilidad de asegurar que la dosis de radiación, requerida por el elaborador, sea recibida por todos los contenedores (por ejemplo por el contenedor más alejado de la fuente de irradiación).

3. La dosis requerida, incluyendo los límites justificados, se especificarán en la autorización de comercialización del producto.

DOSIMETRÍA

4. La dosimetría se define como la medición de la dosis absorbida mediante el uso de dosímetros. Tanto la comprensión como el correcto uso de la técnica son esenciales para la validación, puesta a punto y control del proceso.

5. Cada lote de dosímetro de rutina, empleados durante el proceso, debe ser calibrado usando un estándar nacional o internacional. El período de validez de la calibración se debe especificar y justificar. Se deben adherir etiquetas de identificación con estos datos a los mismos.

6. Se debe utilizar el mismo instrumento para establecer la curva de calibración de los dosímetros de rutina y para medir el cambio en sus absorbancias después de la irradiación. Si se utilizara un instrumento diferente, se debe establecer la absorbancia absoluta de cada uno de ellos.

7. Dependiendo del tipo de dosímetro empleado, se deben tener en cuenta posibles causas de inexactitud, incluyendo el cambio en el contenido de humedad, el de temperatura, el tiempo transcurrido entre la irradiación y la medición y el valor de la dosis.

8. La longitud de onda del instrumento utilizado para medir el cambio en la absorbancia de los dosímetros y el utilizado para medir su amplitud deben encontrarse sujetos a verificaciones regulares de calibración a intervalos establecidos, en función de su estabilidad, fin y uso.

VALIDACIÓN DEL PROCESO

9. La validación es la acción de demostrar que el proceso alcanza los resultados esperados, por ejemplo, la absorción del producto de una dosis pre determinada.

10. La validación debe incluir el mapeo de la dosis para establecer la distribución de las dosis absorbidas por los productos ubicados según un patrón de carga definido dentro de los contenedores de irradiación.

11. La especificación del proceso de irradiación debe incluir, al menos, lo siguiente:

a) los detalles del acondicionamiento del producto;

b) los patrones de carga del producto dentro del contenedor de irradiación. Se debe tener especial recaudo si se mezclan productos diferentes dentro de un mismo contenedor, ya que un producto más denso puede absorber menos dosis o bien impedir que el producto cercano al mismo reciba la dosis correspondiente. Por lo tanto, se debe especificar y validar cada mezcla de producto.

c) El patrón de carga de los contenedores de irradiación alrededor de la fuente (modo por lote) o la trayectoria a través de la celda (modo continuo);

d) los límites máximos y mínimos de la dosis absorbida en el producto [y dosimetría de rutina asociada];

e) los límites máximos y mínimos de las dosis absorbidas en el contenedor de irradiación y dosimetría de rutina asociada para monitorear esta dosis absorbida;

f) otros parámetros de proceso, incluyendo la tasa de dosis, tiempo máximo de exposición, número de exposiciones, entre otros.

Cuando la irradiación se aplica mediante contrato, al menos los puntos (d) y (e) de la especificación del proceso de irradiación deben indicarse en el mismo.

PUESTA A PUNTO DE LA PLANTA

Condiciones Generales

La puesta a punto es el ejercicio de obtener y documentar evidencia de que la planta de irradiación funciona de acuerdo con los límites predeterminados cuando se la opere en correspondencia con la especificación del proceso. En el contexto de este anexo, los límites predeterminados son las dosis máximas y mínimas diseñadas para ser absorbidas por el contenedor de irradiación. No se permite una variación en la operación de la planta que pudiera ocasionar la aplicación de una dosis al contenedor fuera de esos límites, sin el conocimiento del operador.

13. La puesta a punto debe incluir los siguientes elementos:

a) diseño,

b) mapeo de la dosis,

c) documentación,

d) requerimiento de verificación de la puesta a punto.

Irradiadores Gamma

Diseño

14. La dosis recibida por una parte en particular de un contenedor de irradiación, desde cualquier punto específico de la fuente o irradiador depende principalmente de los siguientes factores:

a) la actividad y geometría de la fuente;

b) la distancia desde la fuente hasta el contenedor;

c) la duración de la irradiación controlada por el temporizador o la velocidad de la cinta transportadora;

d) la composición y densidad del material, incluyendo otros productos, entre la fuente y la parte a tratar del contenedor.

15. Además, la dosis absorbida total depende de la trayectoria de los contenedores a través del irradiador continuo o del patrón de carga en un irradiador de lote y del número de ciclos de exposición.

16. Para un irradiador continuo con una trayectoria fija o para un irradiador de lote con un patrón de carga fijo, con una potencia de fuente determinada y tipo de producto dado, el parámetro clave de planta controlado por el operador es la velocidad del transportador o el tiempo prefijado (temporizador).

Mapeo de dosis

17. Para el procedimiento de mapeo de dosis, el proceso puede ser realizado con contenedores de irradiación en los que se ubican productos placebos o productos representativos de densidad uniforme. Los dosímetros se deben colocar en por lo menos tres contenedores de irradiación que serán expuestos al irradiador, rodeados por contenedores cargados en forma similar o productos placebos. Si los productos no se encuentran ubicados uniformemente, se deben colocar dosímetros en un número mayor de contenedores.

18. La ubicación de los dosímetros depende del tamaño del contenedor de irradiación. Por ejemplo, para contenedores de hasta 1 x 1 x 0,5 m, es apropiada una rejilla tridimensional de 20cm en todo el contenedor incluyendo las superficies exteriores. Si se conocen, por ensayos previos, los sitios de impacto en donde se obtienen las dosis de

irradiación mínimas y máximas, se pueden eliminar algunos dosímetros de las posiciones de dosis promedio y se los puede reubicar formando una rejilla de 10cm en las áreas de dosis extrema.

19. Los resultados de este procedimiento proporcionan (para un determinado conjunto de parámetros de funcionamiento de la planta, densidad del producto y patrón de carga) los datos de dosis mínimas y máximas absorbidas por el producto y por la superficie del contenedor.

20. Se deben utilizar dosímetros de referencia para la realización del procedimiento de mapeo de la dosis debido a su mayor precisión. Los dosímetros de rutina están permitidos cuando se colocan dosímetros de referencia al lado de los mismos en las posiciones previstas de dosis mínima y máxima y en la posición de monitoreo de rutina en cada uno de los contenedores de irradiación replicados. Los valores observados de las dosis tendrán una incertidumbre aleatoria asociada que puede estimarse sobre la base de las variaciones en las mediciones replicadas.

21. La dosis mínima necesaria para asegurar que todos los contenedores de irradiación reciban al menos la dosis mínima requerida, debe ser establecida teniendo en cuenta la variabilidad aleatoria de los dosímetros de rutina utilizados.

22. Los parámetros del irradiador se deben mantener constantes, monitoreados y registrados durante el mapeo de la dosis. Se deben conservar estos registros como así también, los resultados de la dosimetría y otros registros generados.

Irradiadores de haz de electrones
Diseño

23. La dosis absorbida por una porción de un producto irradiado depende principalmente de los siguientes factores:

a) las características del haz que incluyen energía del electrón, corriente del haz promedio, amplitud y uniformidad del barrido;

b) la velocidad del transportador;

c) la composición y densidad del producto;

d) la composición, densidad y espesor del material entre la ventana de salida y la parte tratada del producto;

e) la distancia entre la ventana de salida y el contenedor.

24. Los parámetros clave controlados por el operador son las características del haz y la velocidad del transportador.

Mapeo de la dosis

25. Para el procedimiento de mapeo de la dosis, se deben colocar los dosímetros entre capas de placas homogéneas absorbentes que conformen los productos placebos o entre capas de productos representativos de densidad uniforme, de manera que puedan realizarse al menos diez mediciones dentro del rango máximo de los electrones. Asimismo, se deben tener en cuenta los puntos 18 a 21.

26. Los parámetros del irradiador deben mantenerse constantes, monitoreados y registrados durante el mapeo de la dosis. Se deben conservar los registros, como así también, los resultados de la dosimetría y otros registros generados.

Verificación de la puesta a punto

27. La puesta a punto se debe verificar cuando existe un cambio en el proceso o en el irradiador que pudiere afectar la distribución de dosis al contenedor de irradiación (por ej. cambio barras radiactivas). El alcance de la verificación depende de la dimensión del cambio en el irradiador o la carga que haya tenido lugar. En caso de duda, se debe realizar una nueva puesta a punto.

LOCALES

28. Los locales deben ser diseñados y operados para segregar los contenedores irradiados de los no irradiados, a fin de evitar su contaminación cruzada. Cuando los materiales se manejen dentro de contenedores de irradiación cerrados, no es necesario separar los materiales farmacéuticos de los no farmacéuticos, siempre y cuando no exista ningún riesgo de contaminación entre ellos.

Se debe excluir cualquier posibilidad de contaminación de los productos con los núcleos radiactivos de la fuente.

PROCESAMIENTO

29. Los contenedores de irradiación se deben acondicionar de acuerdo con su patrón o patrones de carga específicos establecidos durante la validación.

30. Durante el proceso, se debe monitorear la dosis de radiación aplicada a los contenedores de irradiación utilizando procedimientos de dosimetría validados. La relación entre esta dosis y la dosis absorbida por el producto dentro del contenedor se debe establecer previamente durante la validación del proceso y la puesta a punto de la planta.

31. Los indicadores de radiación se pueden utilizar como ayuda para diferenciar los contenedores irradiados de los no irradiados. No se deben utilizar como único medio de diferenciación o como indicadores de un proceso satisfactorio.

32. El proceso de utilizar cargas diferentes de contenedores dentro de la celda de irradiación sólo se puede realizar cuando existen datos fidedignos, ya sea de los ensayos de la puesta a punto u otra evidencia, de que la dosis de radiación recibida por cada contenedor individual se encuentra dentro de los límites especificados.

33. Cuando la dosis de radiación requerida deba ser aplicada, según el diseño, durante más de una exposición o paso a través de la fuente, se debe contar con el consentimiento del titular de la autorización de comercialización y se debe convenir un período de tiempo predeterminado para hacerlo. Las interrupciones no planificadas durante la irradiación, sobretodo si debido a ellas el proceso de irradiación se extiende más allá del período acordado, se deben notificar al titular de la autorización de la comercialización.

34. Los productos no irradiados se deben separar de los irradiados en todo momento. Los métodos para hacerlo incluyen el uso de indicadores de radiación (punto 31) y el adecuado diseño de los locales (punto 28).

Irradiadores Gamma

35. Para el modo de procesamiento continuo, los dosímetros se deben colocar de tal manera que al menos dos queden expuestos a la radiación todo el tiempo.

36. Para los modos por lotes, al menos dos dosímetros se deben ubicar en las posiciones predeterminadas de dosis mínima.

37. Para el proceso continuo, debe existir un indicador de la posición correcta de la fuente y un interbloqueador entre la posición de la fuente y el movimiento del transportador. La velocidad del transportador se debe controlar y registrar continuamente.

38. Para el proceso por lotes, se debe controlar y registrar el movimiento de la fuente y los tiempos de exposición para cada lote.

39. Para una determinada dosis deseada, el temporizador o la velocidad del transportador requieren el ajuste en función de la vida útil de la fuente (decaimiento o uso de fuente adicional). Se debe registrar y respetar el período de validez del temporizador o la velocidad. Estos datos deben encontrarse en etiquetas adheridos en los instrumentos de medición.

Irradiadores de haz de electrones

40. Se debe colocar un dosímetro en cada contenedor.

41. Debe existir un registro continuo de la corriente promedio del haz, la energía del electrón, la amplitud de barrido y la velocidad del transportador. Dichas variables, exceptuando la velocidad del transportador, se necesitan controlar dentro de los límites establecidos durante la puesta a punto, puesto que son pasibles de un cambio instantáneo.

DOCUMENTACIÓN

42. Las cantidades de contenedores recibidos, irradiados y despachados debe ser conciliadas entre sí y con la documentación relacionada. Cualquier discrepancia se debe informar y resolver.

43. El operador de la planta de irradiación debe certificar por escrito el rango de dosis recibida por cada contenedor irradiado dentro de un lote o entrega.

44. Los registros de procesos y controles para cada lote de irradiación deben ser verificados y firmados por la persona responsable designada y se deben conservar. El método y lugar de conservación debe ser convenido entre el operador de la planta y el titular de la autorización de comercialización.

45. La documentación asociada con la validación y la puesta a punto de la planta se debe conservar hasta un año después de la fecha de vencimiento o, al menos, cinco años después de la liberación del último producto procesado por la planta, según sea el tiempo mayor.

MONITOREO MICROBIOLÓGICO

46. El monitoreo microbiológico es responsabilidad del elaborador farmacéutico. Puede

comprender el monitoreo ambiental del lugar donde se elabora el producto y un monitoreo pre-irradiación del mismo, conforme lo especifique la autorización de comercialización.

ANEXO 13
ELABORACION DE PRODUCTOS FARMACEUTICOS DE INVESTIGACION

PRINCIPIO - Los productos farmacéuticos de investigación deben elaborarse en cumplimiento con los principios y directivas detalladas en la Norma de Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos. Cuando corresponda, deben tenerse en cuenta además, otras normativas vigentes, aplicables a la etapa de desarrollo del producto. Los procedimientos deben ser flexibles a fin de adecuarse a los cambios a medida que avanza el conocimiento del proceso y deben ser apropiados para cada etapa de desarrollo del producto.

En los ensayos clínicos puede existir un riesgo adicional para los sujetos participantes, en comparación con los pacientes tratados con productos comercializados. La aplicación de la Norma de BPF en la elaboración de productos farmacéuticos en investigación tiene la finalidad de asegurar que los sujetos del ensayo no sean expuestos a ningún riesgo y que los resultados de los ensayos clínicos no se vean afectados por una seguridad, calidad o eficacia insuficientes, derivadas de una elaboración inadecuada. De la misma manera, se pretende asegurar que exista consistencia entre lotes del mismo producto farmacéutico en investigación utilizado en el mismo o en diferentes ensayos clínicos y que los cambios durante el desarrollo de un producto farmacéutico en investigación se registren y justifiquen adecuadamente

La elaboración de productos farmacéuticos en investigación conlleva una mayor complejidad en comparación con los productos comercializados, debido a: la inexistencia de procedimientos sistemáticos, la variedad de diseños de ensayos clínicos y, en consecuencia, los diferentes diseños de acondicionamiento, la necesidad, con frecuencia, de ensayos aleatorios y ciegos y el mayor riesgo de contaminación cruzada, confusión de productos y mezcla. Además, puede existir un conocimiento parcial sobre la actividad y toxicidad del producto y puede no disponerse de la completa validación del proceso o, bien pueden utilizarse productos comercializados que hayan sido reacondicionados o modificados de alguna manera.

Estos desafíos requieren personal con un amplio conocimiento y formación en la aplicación de las normas de BPF en productos farmacéuticos en investigación. Asimismo, se requiere la cooperación de los patrocinadores del ensayo, quienes asumen la responsabilidad total de todos los aspectos del ensayo clínico, incluyendo la calidad del producto farmacéutico en investigación.

La mayor complejidad en las operaciones de elaboración hace necesario un sistema de calidad altamente efectivo.

El anexo también incluye pautas sobre la realización de pedidos, el envío y la devolución de insumos clínicos, que se encuentran relacionadas y son complementarias a las normas sobre Buenas Prácticas Clínicas.

NOTA: los sujetos participantes de un ensayo pueden recibir productos que no sean los del ensayo sino placebos o comparadores. Dichos productos pueden utilizarse como medicación de rescate o soporte para prevención, diagnóstico o tratamiento y/o ser necesarios para asegurar que el sujeto reciba atención médica adecuada. Asimismo, pueden utilizarse de acuerdo con el protocolo para inducir una respuesta fisiológica. Estos productos no se hayan comprendidos en la definición de productos farmacéuticos en investigación y pueden ser suministrados por el patrocinador o el investigador. El patrocinador debe asegurar que cumplen con la notificación / solicitud de autorización para realizar el ensayo y que son de la calidad apropiada para los fines del mismo, teniendo en cuenta el origen de los materiales, sean o no objeto de una autorización de comercialización y hayan sido reacondicionados o no. Se recomienda el asesoramiento y la participación de la Persona Autorizada en la tarea en cuestión.

GLOSARIO

Archivo de Especificación de Producto - Archivo de referencia que contiene o refiere a los archivos que contienen toda la información necesaria para redactar instrucciones escritas detalladas sobre el procesamiento, acondicionamiento, ensayos de control de calidad, liberación de lotes y envío de un producto farmacéutico en investigación.

Ciego / Enmascaramiento - Procedimiento en el que uno o más participantes del ensayo carecen de información sobre la asignación o asignaciones del tratamiento. El ciego simple se refiere, por lo general, a que el o los sujetos no tienen el conocimiento y el doble ciego significa que sujeto/s, investigador/es, monitor/es y en algunos casos, analista/s de datos desconocen la/s asignación/es del tratamiento. En relación al producto farmacéutico de investigación, ciego

significa el enmascaramiento deliberado de la identidad del producto, de acuerdo con las instrucciones del patrocinador. El desenmascaramiento significa la revelación de la identidad de los productos objeto del ciego.

Código de Randomización - Listado que identifica el tratamiento asignado a cada sujeto resultante del proceso de randomización.

Elaborador/Importador de Productos Farmacéuticos de Investigación - Cualquier titular de una habilitación de elaboración / importación.

Empaque/Acondicionamiento secundario - Estuche en que se coloca el envase de acondicionamiento primario.

Ensayo clínico - Cualquier investigación en humanos con el fin de descubrir o verificar los efectos clínicos, farmacológicos y/u otros farmacodinámicos de un producto de investigación y/o de identificar cualquier reacción adversa a un producto en investigación y/o estudiar la absorción, distribución, metabolismo y excreción de uno o más productos farmacéuticos de investigación con el objeto de determinar su seguridad y/o eficacia.

Envase primario - Envase u otra forma de acondicionamiento que se encuentre en contacto directo con el producto farmacéutico ya sea de investigación o no.

Envío - Operación de acondicionamiento para envío y transporte los productos farmacéuticos para ensayos clínicos.

Investigador - Persona responsable de la realización del ensayo clínico en el sitio donde se lleva a cabo. Si un ensayo es conducido por un equipo de individuos en el sitio de investigación, el investigador es el líder responsable del equipo y también puede recibir el nombre de investigador principal.

Patrocinador - Individuo, empresa, institución u organización responsable de la iniciación, administración y/o financiamiento de un ensayo clínico.

Pedido/Orden - Instrucción de procesar, acondicionar y/o enviar un cierto número de unidades de producto/s farmacéutico/s de investigación.

Producto comparador - Producto de investigación o comercializado (es decir de control activo), o placebo, utilizado como referencia en un ensayo clínico.

Producto farmacéutico de investigación - Forma farmacéutica de una sustancia activa o placebo que se evalúa o utiliza como referencia en un ensayo clínico, incluyendo un producto con autorización de comercialización cuando se lo utiliza o prepara (formulado o acondicionado) de forma diferente a la autorizada o cuando se lo utiliza en una indicación no autorizada o, bien, cuando se lo emplea para obtener mayor información sobre la forma autorizada.

Randomización - Proceso de asignación de los sujetos del ensayo a grupos de tratamiento o control, utilizando un elemento de aleatoriedad para determinar las asignaciones, a fin de reducir el sesgo.

GESTIÓN DE CALIDAD

1. El sistema de calidad, diseñado, implementado y comprobado por el elaborador o el importador debe ser descriptos en procedimientos escritos disponibles para el patrocinador, teniendo en cuenta los principios de las Normas de BPF y las normativas aplicables a los productos farmacéuticos de investigación.

2. Las especificaciones del producto y las instrucciones de elaboración pueden modificarse durante el desarrollo, pero se debe mantenerse un absoluto control y trazabilidad sobre dichas modificaciones.

PERSONAL

3. Todo el personal involucrado con productos farmacéuticos de investigación debe recibir la capacitación adecuada en los requerimientos específicos de ese tipo de producto.

4. El responsable técnico debe ser, en particular, responsable de asegurar que los sistemas implementados cumplan con los requerimientos del presente Anexo y, por lo tanto, debe poseer un amplio conocimiento de los procesos de desarrollo farmacéutico y procedimientos de ensayos clínicos.

LOCALES Y EQUIPAMIENTO

5. Es posible que no se comprenda plenamente la toxicidad, la actividad y el potencial sensibilizante de los productos farmacéuticos de investigación, razón por la cual, se incrementa la necesidad de minimizar todos los riesgos de contaminación cruzada. El diseño del equipamiento y los locales, los métodos de inspección / evaluación y los límites de aceptación a ser

utilizados después de la limpieza deben contemplar la naturaleza de estos riesgos. Cuando corresponda, debe considerarse el trabajo en campaña. Asimismo, se debe tener en cuenta la solubilidad del producto en las decisiones concernientes a la elección del agente de limpieza.

DOCUMENTACIÓN

Especificaciones e instrucciones

6. Las especificaciones (de la materia prima, materiales de acondicionamiento, productos intermedios, a granel y productos terminados), las fórmulas maestras de elaboración y las instrucciones de fabricación y acondicionamiento deben ser suficientemente claras y basadas en los conocimientos actualizados. Se las deberá reevaluar periódicamente durante el desarrollo y actualizarse conforme sea necesario. Cada nueva versión debe tener en cuenta los últimos datos, la tecnología utilizada en el momento, los requerimientos regulatorios y de farmacopeas y debe permitir la trazabilidad al documento anterior. Todas las modificaciones deben efectuarse según un procedimiento escrito, que debe tener en cuenta cualquier implicancia en la calidad del producto como la estabilidad y la bioequivalencia.

7. Debe registrarse la justificación de las modificaciones (cambios) y se deben investigar y documentar las consecuencias de una modificación en la calidad de un producto y en los ensayos clínicos en curso.

Orden

8. El pedido debe solicitar el procesamiento y/o el acondicionamiento de un cierto número de unidades y/o su envío y debe ser entregado al elaborador por el patrocinador o en su representación. Debe ser por escrito (aunque se podrá transmitir por medios electrónicos) y lo suficientemente preciso y detallado para evitar toda ambigüedad. Debe ser formalmente autorizado y debe referirse al Archivo de Especificación de Producto y al protocolo de ensayo clínico pertinente, según corresponda.

Archivo de Especificación de Producto

9. El Archivo de Especificación de Producto (ver glosario) debe actualizarse continuamente según el avance del desarrollo del producto, asegurando la trazabilidad a las versiones anteriores. Debe incluir o hacer referencia a los siguientes documentos:

a) especificaciones y métodos analíticos de los materiales de partida, materiales de acondicionamiento, producto intermedio, a granel y terminado.

b) métodos de elaboración.

c) controles en proceso y métodos de ensayo.

d) copia del rótulo aprobado.

e) protocolos de los ensayos clínicos pertinentes y códigos de randomización, según corresponda.

f) acuerdos técnicos correspondientes con los contratantes, según corresponda.

g) datos de estabilidad.

h) condiciones de almacenamiento y envío.

Este listado no es exclusivo ni completo, los contenidos varían según el producto y la etapa del desarrollo. La información debe ser la base para la evaluación de la aptitud para la certificación y liberación de un lote en particular por parte de la Persona Autorizada y debe, por tanto, encontrarse disponible para dicha persona. Cuando diferentes etapas de elaboración se llevan a cabo en sitios diferentes, bajo la responsabilidad de distintas Personas Autorizadas, se acepta conservar archivos separados limitados a la información pertinente de las actividades de los sitios respectivos.

Fórmula Maestra e Instrucciones de Fabricación

10. Para cada operación de elaboración o suministro deben existir instrucciones escritas claras y apropiadas, como así también registros escritos. Cuando una operación no es repetitiva, puede no ser necesario elaborar la fórmula maestra ni las instrucciones de fabricación. Los registros son de vital importancia para la preparación de la versión final de los documentos a utilizar en la elaboración de rutina, una vez otorgada la autorización de comercialización.

11. La información contenida en el Archivo de Especificación de Producto debe utilizarse para elaborar las instrucciones escritas detalladas sobre la fabricación/procesamiento, acondicionamiento, ensayos de control de calidad y condiciones de almacenamiento y envío.

Instrucciones de Acondicionamiento

12. Por lo general, los productos farmacéuticos en investigación se acondicionan de manera

individual para cada sujeto participante del ensayo clínico. El número de unidades a ser acondicionadas debe especificarse antes del inicio de las operaciones de acondicionamiento, incluyendo también las unidades necesarias para realizar el control de calidad y las muestras de retención a conservar. Se deben realizar las conciliaciones necesarias para asegurar que cada etapa de procesamiento se ajusta a la cantidad correcta de cada producto.

Registros de elaboración, control y acondicionamiento

13. Los registros de lotes deben ser lo suficientemente detallados para que pueda reconstruirse de manera exacta la secuencia de las operaciones. Dichos registros deben contener todas las observaciones pertinentes que justifiquen los procedimientos utilizados, cualquier modificación efectuada, que aumente el conocimiento del producto y mejore las operaciones de elaboración.

14. Los registros de lote se deben conservar al menos hasta dos años después de que haya sido registrado el producto.

PRODUCCIÓN

Materiales de acondicionamiento

15. Las especificaciones y las pruebas de control de calidad deben incluir medidas de protección contra el desenmascaramiento accidental causado por cambios en el aspecto entre diferentes lotes de materiales de acondicionamiento.

Operaciones de elaboración

16. Durante el desarrollo se deben identificar los parámetros críticos y deben utilizarse fundamentalmente los controles en proceso para mantener el proceso bajo control. Pueden deducirse parámetros de producción y los controles en proceso provisorios a partir de la experiencia previa, incluyendo la obtenida de un trabajo de desarrollo anterior. Se requiere una cuidadosa consideración por parte del personal clave, a fin de formular las instrucciones necesarias y adaptarlas continuamente a la experiencia obtenida en la producción. Los parámetros identificados y controlados deben ser justificados en base al conocimiento disponible en el momento.

17. Los procesos de producción para los productos farmacéuticos de investigación pueden no estar validados en el mismo grado que para la producción de rutina, sin embargo, se deben calificar los locales y el equipamiento. Para los productos estériles, la validación de los procesos de esterilización debe cumplir con el mismo estándar que de los medicamentos autorizados para la comercialización. Asimismo, cuando corresponda, se debe demostrar la inactivación/eliminación de un virus u otras impurezas de origen biológico, a los efectos de garantizar la seguridad de los productos biotecnológicos, siguiendo los principios científicos y técnicas definidos en las normas concernientes a esta materia.

18. La validación de los procesos asépticos presenta especiales problemas cuando el tamaño del lote es pequeño; en estos casos, el número de unidades llenadas debe ser el máximo número llenado en la producción. De ser posible, y por otra parte compatible con la operación simulada, se debe llenar un número mayor de unidades con medios de cultivo, para proporcionar mayor nivel de confianza en los resultados obtenidos. Por lo general, el llenado y sellado son operaciones manuales o semiautomáticas hecho que representan grandes desafíos para la esterilidad exigiendo mayor atención a la capacitación del personal y la validación de la técnica aséptica con cada operario que intervenga.

Principios aplicables al producto comparador

19. Si se modifica un producto, se debe disponer de datos (por ej. estabilidad, disolución comparativa, biodisponibilidad) para demostrar que tales cambios no alteran significativamente las características de calidad originales del producto.

20. La fecha de vencimiento establecida para el producto comparador en su envase original puede no ser aplicable al producto cuando éste se haya reacondicionado en un envase diferente, ya que quizás, no ofrezca protección equivalente o no sea compatible con el producto. El patrocinador o alguien en su representación debe determinar una fecha límite de uso teniendo en cuenta la naturaleza del producto, las características del envase y las condiciones de almacenamiento a las que pueda ser sometida la unidad. Dicha fecha debe justificarse y nunca ser posterior a la fecha de vencimiento del envase original. Debe existir compatibilidad entre la fecha de vencimiento y la duración del ensayo clínico.

Operaciones de enmascaramiento

21. En los casos en los que se enmascaran los productos se deben implementar sistemas que aseguren que el enmascaramiento se ha logreado y mantenido, al tiempo que permita cuando sea necesario, la identificación de productos enmascarados, incluyendo los números de lotes de los productos antes de la operación de enmascaramiento. Asimismo, debe ser posible la rápida identificación de los productos en caso de emergencia.

Código de randomización

22. Los procedimientos deben describir la generación, seguridad, distribución, manipulación y conservación de los códigos de randomización utilizados en el acondicionamiento de los productos de investigación, como así también, los mecanismos de decodificación. Se deben llevar los registros adecuados correspondientes.

Acondicionamiento

23. Durante el acondicionamiento de productos farmacéuticos de investigación, puede ser necesario manipular diferentes productos en la misma línea de acondicionamiento al mismo tiempo. Se debe minimizar el riesgo de mezcla y confusión de productos mediante el uso de procedimientos adecuados y/o equipamiento especializado según corresponda, como así también, mediante la capacitación específica del personal.

24. Probablemente, el acondicionamiento y el rotulado de los productos farmacéuticos de investigación sean más complejos y propensos a errores (también más difíciles de detectar) que los de productos comercializados, en especial, cuando se utilizan productos enmascarados de aspecto similar. Se deben intensificar los recaudos para evitar el rotulado erróneo, como por ej. la conciliación de rótulos, la liberación de la línea, controles en proceso realizado por personal adecuadamente capacitado.

25. El acondicionamiento debe garantizar que el producto farmacéutico de investigación permanezca en buena condición durante el transporte y almacenamiento en destinos intermedios. Cualquier apertura o alteración en el empaque externo durante el transporte debe ser fácilmente detectable.

Rotulado

26. La tabla 1 resume el contenido de los puntos 26 a 30 que se describen a continuación. La siguiente información se debe incluir en los rótulos, a menos que su ausencia sea debidamente justificada, por ej. si se utiliza un sistema de randomización electrónico centralizado:

a) nombre, domicilio y número de teléfono del patrocinador, organización de investigación contratada o investigador (el contacto principal para dar información sobre el producto, ensayo clínico y desenmascaramiento de emergencia);

b) forma farmacéutica, vía de administración, cantidad de unidades de dosis y en el caso de ensayos abiertos, nombre / identificador y concentración / potencia;

c) el número de lote o código para identificar el contenido y la operación de acondicionamiento;

d) código de referencia del ensayo que permita la identificación del ensayo, sitio de ensayo, investigador y patrocinador, si no figura en otro lugar;

e) número de identificación / tratamiento del sujeto participante del ensayo y, de corresponder, número de visita;

f) nombre del investigador (si no está incluido en a) ó d));

g) instrucciones de uso (se puede hacer referencia al prospecto u otro documento explicativo destinado al sujeto participante del ensayo o a la persona que administre el producto);

h) la frase “Para ensayo clínico únicamente” o similar;

i) condiciones de almacenamiento;

j) período de uso (fecha límite de uso, de vencimiento o de reanálisis según corresponda), en formato mes / año y de manera tal que evite la ambigüedad.

k) frase “mantener fuera del alcance de los niños” excepto cuando el producto se utilice en ensayos en los que los sujetos participantes no lo llevan a su casa.

27. No es necesario que el domicilio y el número de teléfono del contacto principal de información sobre el producto, el ensayo clínico y desenmascaramiento de emergencia se exhiban en el rótulo, siempre y cuando el sujeto participante haya recibido un prospecto o tarjeta que proporcione estos datos y se lo haya

convenientemente instruido para que lo conserve consigo permanentemente.

28. Los detalles deben figurar en el idioma oficial del país. Los detalles enumerados en el ítem 26 deben visualizarse en el envase primario y en el secundario (con excepción de envases primarios descriptos en los puntos 29 y 30). En la tabla 1 se resumen los requerimientos relacionados con los contenidos de los rótulos del envase primario y del secundario. Pueden incluirse la información en otros idiomas.

29. Cuando el producto se proporcione al sujeto del ensayo o a la persona que administre la medicación dentro de un envase primario junto con su envase secundario debiendo ambos permanecer juntos, y siendo que el acondicionamiento secundario posee los detalles enumerados en el punto 26, se debe incluir la siguiente información en el rótulo del envase primario (o cualquier dispositivo de dosificación sellado que contenga el envase primario):

a) nombre del patrocinador, organización de investigación o investigador contratados;

b) forma farmacéutica, vía de administración (puede excluirse para las formas farmacéuticas sólidas orales), cantidad de unidades de dosis y en el caso de ensayos abiertos, el nombre / identificador y concentración / potencia;

c) el número de lote o código para identificar el contenido y la operación de acondicionamiento;

d) código de referencia del ensayo que permita la identificación del ensayo, sitio de ensayo, investigador y patrocinador, de no encontrarse en otro lugar;

e) número de identificación / tratamiento del sujeto participante del ensayo y, de corresponder, número de visita;

30. Si el envase primario es un blíster o son unidades pequeñas como ser ampollas en los que los detalles enumerados en el punto 26 no se pueden exhibir, dicha información debe figurar en un rótulo del envase externo (secundario). Sin embargo, el envase primario debe contener la siguiente información:

a) nombre del patrocinador, organización de investigación o investigador contratados;

b) vía de administración (puede excluirse para las formas de dosis sólidas orales), cantidad de unidades de dosis y en el caso de ensayos abiertos, el nombre/identificador y concentración / potencia;

c) número de lote o código para identificar el contenido y la operación de acondicionamiento;

d) código de referencia del ensayo que permita la identificación del ensayo, sitio, investigador y patrocinador, de no encontrarse en otro lugar;

e) número de identificación/tratamiento del sujeto participante del ensayo y, de corresponder, número de visita.

31. Se pueden incluir símbolos o pictogramas para aportar mayor claridad a la información antes mencionada. Además, puede incluirse información adicional, advertencias y/o instrucciones de uso.

32. Para los ensayos clínicos con ciertas características debe añadirse la siguiente información al envase original, pero sin superponerse con los del rótulo original:

i) nombre del patrocinador, organización de investigación o investigador contratados;

ii) código de referencia del ensayo que permita la identificación del sitio del ensayo, investigador y sujeto del ensayo.

33. De ser necesaria la modificación de la fecha límite de uso, se debe colocar un rótulo adicional al producto farmacéutico de investigación. Este rótulo adicional debe especificar la nueva fecha y repetir el número de lote. Puede colocarse sobre la antigua fecha límite de uso, sin embargo, por razones de control de calidad, no puede colocarse sobre el número de lote original. Esta operación debe realizarse en un sitio de elaboración debidamente habilitado. Sin embargo, cuando esté justificado, podrá realizarse en el mismo sitio de investigación por o bajo la supervisión del farmacéutico del sitio del ensayo clínico. Cuando esto no sea posible, podrá efectuarse mediante un monitor del ensayo clínico debidamente capacitado. La operación debe llevarse a cabo en cumplimiento de los principios de las BPF, procedimientos operativos estándar y específicos, contemplados, de corresponder, en el contrato. La operación debe ser verificada por una segunda persona. Este rotulado adicional debe ser debidamente documentada tanto en la documentación del ensayo como en el registro de lote.

CONTROL DE CALIDAD

34. Como los procesos quizá no están estandarizados o completamente validados, los controles sobre el producto cobran mayor importancia en garantizar que cada lote cumple con sus especificaciones.

35. El control de calidad debe ser realizado de acuerdo con el Archivo de Especificación de Producto y de acuerdo con la información requerida. Se debe verificar y registrar la efectividad del enmascaramiento.

36. Se deben conservar muestras de cada lote del producto farmacéutico de investigación, incluyendo el producto enmascarado por el período requerido, por lo menos dos años después de registrado el producto.

37. Debe conservarse muestras de retención de cada etapa de acondicionamiento/fase del ensayo, hasta que se haya preparado el informe del clínico para poder identificar el producto en cada una de las fases, si es necesario, y como parte de una investigación en el caso de que los resultados del ensayo clínico no sean consistentes

LIBERACIÓN DE LOTES

38. La liberación de productos farmacéuticos en investigación no debe ocurrir hasta que el Responsable Técnico haya certificado que los requerimientos pertinentes se han cumplido. El Responsable Técnico debe tener en cuenta los elementos enumerados en el punto 39 según corresponda.

39. La evaluación de cada lote para su certificación antes de la liberación puede incluir lo siguiente, según corresponda:

a) registro de lote, incluyendo los informes de control de calidad, informes de los controles en proceso y de liberación que demuestren que el producto cumple con el archivo de especificación del producto, la orden, el protocolo y el código de randomización. Dichos registros deben incluir todos los desvíos o modificaciones planificadas y cualquier verificación o ensayo adicional subsiguiente y debe ser completado y avalado por el personal autorizado a tal efecto, de acuerdo con el sistema de calidad;

b) condiciones de producción;

c) el estado de validación de las instalaciones, procesos y métodos;

d) la evaluación de los empaques terminados

e) los resultados de cualquier análisis o ensayo desarrollados después de la importación, si correspondiera

f) informes de estabilidad

g) la fuente y verificación de las condiciones de almacenamiento, distribución y transporte

h) informes de auditorías concernientes al sistema de calidad del elaborador

i) documentación que certifique que el elaborador está autorizado a elaborar productos farmacéuticos de investigación o comparadores para exportación expedida por las autoridades competentes del país exportador

j) si fuera necesario, los requerimientos regulatorios para autorización de comercialización, estándares de BPF aplicables y cualquier verificación oficial del cumplimiento con las BPF

k) todos los otros factores de los que el Responsable Técnico tiene conocimiento y que son importantes a la calidad del lote.

El grado de importancia de los elementos arriba mencionados se ve afectada por el país de origen del producto, el elaborador y el estado de comercialización del producto (con o sin autorización de comercialización en el país de origen) y su etapa de desarrollo.

El patrocinador debe garantizar que los elementos tenidos en cuenta por el Responsable Técnico cuando certifica el lote sean concordantes con la documentación requerida.

40. En los casos en que los productos farmacéuticos de investigación se elaboran y acondicionan en sitios diferentes, bajo la supervisión de distintos responsables técnicos, se deben seguir las recomendaciones según corresponda.

41. Las actividades de acondicionamiento y rotulado, pueden desarrollarse en el sitio de investigación por o bajo la supervisión de un farmacéutico de ensayos clínicos u otro profesional de la salud, según lo contemplen la normativa específica vigente. Sin embargo, el patrocinador es responsable de asegurar que la actividad sea debidamente documentada y desarrollada en cumplimiento con los principios de las BPF y debe recurrir al asesoramiento del Responsable Técnico en este aspecto.

ENVÍO

42. El envío de los productos debe realizarse de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por o en representación del patrocinador en la orden de envío.

43. Los productos farmacéuticos de investigación deben permanecer bajo el control del patrocinador hasta que se haya completado el procedimiento de liberación de dos pasos: certificación del Responsable Técnico y liberación después de haber cumplido los requerimientos correspondientes. El patrocinador debe garantizar que los mismos son coincidentes con los detalles contemplados por el Responsable Técnico. Ambas liberaciones deben registrarse y conservarse en los archivos del ensayo principales mantenidos por el patrocinador o alguien en su representación.

44. Antes que los productos farmacéuticos de investigación se envíen al sitio de investigación, el personal responsable correspondiente debe disponer de los procedimientos de decodificación.

45. El elaborador o importador debe llevar un inventario detallado de los envíos efectuados. En particular, debe mencionar la identificación de los destinatarios.

46. El envío de productos farmacéuticos de investigación de un sitio de investigación a otro debe ser una excepción. Dichos traslados deben realizarse bajo procedimientos operativos estándar. El historial del producto mientras se encuentra fuera del control del elaborador, obtenida a través de, por ejemplo, informes de monitoreo del ensayo y registro de las condiciones de almacenamiento en el sitio original del ensayo, debe revisarse como parte de la evaluación de la aptitud del producto para el transporte; asimismo, se debe recurrir al asesoramiento del Responsable Técnico. De ser necesario re-etiquetar el producto, se debe devolver al elaborador u otro elaborador autorizado y recertificación de una persona autorizada. Se deben conservar registros y asegurar la total trazabilidad.

RECLAMOS

48. El elaborador o importador y el patrocinador (de ser diferentes) deben analizar conjuntamente las conclusiones de cualquier investigación desarrollada en relación con un reclamo que pueda surgir de la calidad de un producto. Este análisis debe involucrar al Responsable Técnico y a los responsables del ensayo clínico pertinente, a fin de evaluar cualquier impacto potencial sobre el ensayo, el desarrollo del producto y en los sujetos.

RETIROS DE PRODUCTO Y DEVOLUCIONES

Retiros de productos

49. El patrocinador y el elaborador o importador (en caso de diferir) deben acordar los procedimientos para recuperar los productos farmacéuticos de investigación y deben registrar dicha recuperación. El investigador y el monitor deben comprender sus obligaciones en el procedimiento de recuperación.

50. El patrocinador debe asegurar que el proveedor de cualquier comparador o medicación a ser utilizada en el ensayo clínico posea un sistema para comunicar al patrocinador la necesidad de retirar cualquier producto suministrado.

Devoluciones

51. Los productos farmacéuticos de investigación se deben devolver de acuerdo con las condiciones acordadas y definidas por el patrocinador, especificadas en procedimientos escritos aprobados.

52. Los productos farmacéuticos de investigación devueltos deben identificarse claramente y se deben almacenar en un área exclusiva debidamente controlada. Se deben llevar registros de los medicamentos devueltos.

DESTRUCCIÓN

53. El patrocinador es responsable de la destrucción de los productos farmacéuticos de investigación no utilizados y/o devueltos. Por lo tanto, los productos farmacéuticos de investigación no se deben destruir sin la previa autorización escrita del patrocinador.

54. En cada sitio y período de ensayo, el patrocinador o alguien en su representación debe registrar, conciliar y verificar las cantidades de producto entregadas, utilizadas y recuperadas. La destrucción de los productos farmacéuticos de investigación no utilizados se debe realizar en función de un sitio o período de ensayo determinados, solamente después de haber investigado y explicado satisfactoriamente cualquier discrepancia y de haber aceptado además la conciliación. Se debe desarrollar el registro de las operaciones de destrucción de manera tal que se

incluyan todas las operaciones. El patrocinador debe conservar dichos registros.

55. El patrocinador debe recibir un certificado fechado o manifiesto de destrucción de los productos farmacéuticos de investigación involucrados. Tales documentos deben claramente identificar o permitir la trazabilidad a los lotes y/o números de pacientes involucrados y las cantidades reales destruidas.

Tabla 1. RESUMEN DE LOS DETALLES DEL ROTULADO (§26 A 30)

a) nombre, domicilio y número de teléfono del patrocinador, organización de investigación contratada o investigador (el contacto principal para información sobre el producto, ensayo clínico y desenmascaramiento de emergencia);

b) forma farmacéutica, vía de administración, cantidad de unidades de dosis y en el caso de ensayos abiertos, nombre/identificador y concentración / potencia;

c) el número de lote o código para identificar el contenido y la operación de acondicionamiento;

d) código de referencia del ensayo que permita la identificación del ensayo, sitio, investigador y patrocinador, de no encontrarse en otro lugar;

e) número de identificación/tratamiento del sujeto participante del ensayo y, de corresponder, número de visita;

f) nombre del investigador (si no está incluido en a) ó d));

g) instrucciones de uso (se puede hacer referencia a un prospecto u otro documento destinado al sujeto del ensayo o a la persona que administre el producto);

h) la frase “para ensayo clínico únicamente” o similar;

i) condiciones de almacenamiento;

j) período de uso (fecha límite de uso, de vencimiento o de re análisis según corresponda), en formato mes/año y de manera tal que evite la ambigüedad.

k) La frase “mantener fuera del alcance de los niños” excepto cuando el producto se utilice en ensayos en los que los sujetos no lo llevan a su casa.

[1] El domicilio y número de teléfono del contacto principal para información sobre el producto, ensayo clínico y desemascaramiento de emergencia no necesita aparecer en la etiqueta cuando se ha dado un prospecto o una tarjeta que proporcionan estos detalles y se han dado instrucciones para mantenerlos siempre.

[2] El domicilio y número de teléfono del contacto principal para información sobre el producto, ensayo clínico y desemascaramiento no necesita estar incluido

[3] La ruta de la administración se puede excluir para la dosis sólida oral

[4] La forma farmacéutica de dosificación y la cantidad de unidades de la dosificación pueden ser omitidas

[5] Cuando el envase externo lleva los detalles enumerados en el punto 26

ANEXO 14

ELABORACION DE PRODUCTOS DERIVADOS DE SANGRE Y PLASMA HUMANO

PRINCIPIO - Los productos medicinales biológicos derivados de sangre o plasma humano (hemoderivados), pueden tener como materiales de partida células o fluidos incluyendo sangre y plasma. Los hemoderivados poseen ciertas características que surgen de la naturaleza biológica del material del que proceden. Por ejemplo, este material de origen puede estar contaminado por agentes transmisores de enfermedades, en especial los virus. La seguridad de estos productos depende del control de los materiales de partida y su origen, como así también, de los procesos de elaboración subsiguientes, incluyendo la remoción e inactivación del virus.

A menos que se especifique lo contrario, los capítulos generales de las BPF aplican a los productos derivados de sangre y plasma humano. De igual manera, también aplican algunos de los anexos, por ej. elaboración de medicamentos estériles, el uso de radiación ionizante en la elaboración de medicamentos, elaboración de medicamentos biológicos y sistemas informáticos.

Dado que la calidad del producto final se ve afectada por todas las etapas de la fabricación, incluyendo la recolección de sangre o plasma, todas las operaciones deben desarrollarse de acuerdo con un apropiado sistema de Aseguramiento de la Calidad y las normas de Buenas Prácticas de Fabricación vigentes.

El elaborador debe tomar las medidas necesarias para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas y se deben aplicar los requerimientos y estándares de las monografías de la Farmacopea Argentina (u otras farmacopeas internacionalmente reconocidas) sobre el plasma humano para fraccionamiento y de los productos medicinales derivados de sangre o plasma.

Lo establecido en este anexo se aplica a medicamentos derivados de sangre y plasma humano. No comprenden los componentes utilizados en la medicina transfusional. Sin embargo, gran parte de los lineamientos aquí dispuestos, pueden aplicarse a dichos componentes y las autoridades competentes pueden exigir su cumplimiento.

GLOSARIO

Sangre - Toda la sangre extraída de un solo donante y procesada ya sea para transfusión o posterior elaboración.

Componentes sanguíneos - Componentes terapéuticos de la sangre (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plasma, plaquetas), que se pueden preparar mediante centrifugación, filtración y freezado utilizando una metodología de banco de sangre convencional.

Medicamento derivado de la Sangre o plasma-hemoderivado - Medicamento basado en componentes de la sangre los cuales son preparados de forma industrial por establecimientos públicos o privados.

GESTIÓN DE CALIDAD

1. El Aseguramiento de la Calidad deberá comprender todas las etapas previas a la obtención del producto terminado, desde la extracción (incluyendo la selección del donante, las bolsas de sangre, las soluciones anticoagulantes y los reactivos y equipos usados en los ensayos serológicos) hasta el almacenamiento, transporte, procesamiento, control de calidad y distribución del producto terminado, todo en cumplimiento de los textos mencionados en el Principio del comienzo de este Anexo.

2. La sangre o el plasma extraído como material de origen para la elaboración de medicamentos se debe recolectar en establecimientos destinados a tal fin y los deben analizar laboratorios sujetos a inspección y habilitados por la autoridad competente.

3. Los procedimientos para determinar la idoneidad de los individuos como donantes de sangre y plasma, utilizados como material de origen en la elaboración de medicamentos y los resultados de los análisis de sus donaciones, deben ser documentados por el centro de extracción y deben encontrarse disponibles para el elaborador del medicamento.

4. El monitoreo de la calidad de los hemoderivados se debe desarrollar de tal manera que se pueda detectar cualquier desvío de las especificaciones de calidad.

5. Los hemoderivados devueltos sin utilizar no se deben comercializarse nuevamente: (ver también punto 5.65 de la guía de BPF principal).

LOCALES Y EQUIPAMIENTO

6. Los locales utilizados para la extracción de sangre o plasma deben poseer dimensiones, construcción y ubicación adecuadas a fin de facilitar su correcto funcionamiento, limpieza y mantenimiento. La extracción, el procesamiento y el análisis de la sangre y el plasma no deben realizarse en la misma área. Deben existir instalaciones apropiadas para realizar entrevistas a los donantes en privado.

7. El equipamiento de elaboración, extracción y análisis se debe diseñar, calificar y mantener para cumplir con su fin pretendido y no deben presentar ningún riesgo. Se debe efectuar y registrar el mantenimiento y calibración de acuerdo con procedimientos establecidos.

8. En la preparación de hemoderivados se deben utilizar procedimientos de inactivación o remoción viral y se deben tomar las medidas necesarias para evitar la contaminación cruzada de los productos tratados con los no tratados; los locales y el material utilizado para los productos tratados deben ser específicos y distintos de los utilizados para los productos no tratados.

RECOLECCIÓN DE SANGRE Y PLASMA

9. Debe existir un contrato entre el elaborador de hemoderivados y el centro de donación o el organismo encargado de la extracción de la sangre o del plasma.

10. Se debe identificar cada donante de forma inequívoca en la recepción y nuevamente en el momento de la extracción.

11. Se debe definir y demostrar la eficacia del método de desinfección de la piel del donante. Este método debe ser manteniendo.

12. Se debe comprobar por segunda vez por separado los rótulos de cada donación, para asegurar que el rótulo de las bolsas de sangre, tubos de toma de muestra y registros de donación sean idénticos.

13. Las bolsas de sangre y los sistemas de aféresis deben ser inspeccionados para determinar daño o contaminación antes de ser utilizados para recolectar sangre o plasma. Debe registrarse el número de lote de las bolsas de sangre y de los sistemas de aféresis, a fin de asegurar la trazabilidad.

TRAZABILIDAD Y MEDIDAS POST RECOLECCIÓN

14. Aún respetando totalmente la confidencialidad, debe existir un sistema que permita el rastreo bidireccional de cada donación, desde el donante hasta el producto terminado y viceversa, incluyendo el cliente (hospital o profesional de la salud). Por lo general, es responsabilidad del cliente identificar al receptor.

15. Medidas post-extracción: Se debe implementar un sistema entre el centro recolector de sangre y plasma y el elaborador / fraccionador, a los efectos de que puedan informarse mutuamente si después de la donación:

1. se descubre que el donante no cumplía con el criterio sanitario requerido para los donantes;

2. una donación posterior de un donante previamente calificado como negativo en función de marcadores virales en ocasiones anteriores, resultó positiva para cualquiera de los marcadores virales;

3. se descubre que el análisis de marcadores virales no se efectuó de acuerdo con los procedimientos operativos;

4. el donante ha desarrollado una enfermedad infecciosa causada por un agente potencialmente transmisible por productos derivados de plasma (VHB, VHC, VHA y otros virus de hepatitis no-A, no-B, no-C, VIH 1 y 2 y otros agentes según el conocimiento disponible);

5. el donante desarrolla la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ ó VECJ);

6. el receptor de la sangre o un componente de la misma desarrolla una infección con posterioridad a una transfusión / infusión que implica o se puede atribuir al donante.

Los procedimientos a seguir en el caso de cualquiera de los acontecimientos anteriormente descriptos deben estar establecidos en procedimientos operativos estándar. La investigación retrospectiva debe consistir en rastrear las donaciones anteriores efectuadas al menos seis meses antes de la última donación negativa. En cualquiera de los casos anteriores, siempre se deberá realizar una reevaluación de la documentación del lote. Debe considerarse la necesidad de retirar el lote en cuestión, teniendo en cuenta criterios tales como el del agente transmisible implicado, el tamaño de la mezcla de plasmas, el período entre la donación y la seroconversión, la naturaleza del producto y su

método de elaboración. Cuando existan indicios de que una donación parte de una mezcla de plasma estaba infectada con VIH o hepatitis A, B o C, se debe informar a la autoridad sanitaria competente, responsable de la autorización del producto farmacéutico y la compañía debe informar sobre la conveniencia en continuar la elaboración con la mezcla de plasma implicada o de la posibilidad de retiro del producto o productos del mercado.

PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD

16. Antes de liberar para la expedición y/o fraccionamiento cualquier donación de sangre y plasma o producto de ellos derivados, deben ser sometidos individualmente a ensayos mediante un método validado de sensibilidad y especificidad adecuada, para detectar los siguientes marcadores o agentes específicos transmisores de enfermedad:

- HBsAg;
- Anticuerpos para VIH 1 y VIH 2;
- Anticuerpos para VHC.

Si una de estas pruebas da un resultado reactivo repetidamente, la donación no es aceptable.

(La autoridad sanitaria puede exigir análisis adicionales).

17. Se deben controlar y validar las temperaturas de almacenamiento especificadas para la sangre, el plasma y los productos intermedios, tanto en los depósitos como en el transporte desde los centros de donación/recolección hacia los elaboradores, o entre diferentes sitios de fabricación. Lo mismo se aplica a la entrega de estos productos.

18. La mezcla inicial de plasma homogéneo (por ej. después de la separación del crioprecipitado) se debe analizar mediante un método validado de sensibilidad y especificidad adecuadas y debe ser no reactiva para los siguientes marcadores de agentes transmisores de enfermedad:

- HBsAg;
- Anticuerpos para VIH 1 y VIH 2;
- Anticuerpos para VHC.

Las mezclas confirmadas como positivas deben rechazarse.

19. Sólo deben liberarse los lotes derivados de mezcla de plasma analizados y con resultado no reactivo para ARN del VHC por medio de la tecnología de amplificación de ácido nucleico (TAN) utilizando un método de ensayo validado de sensibilidad y especificidad adecuadas

20. Los requerimientos de análisis para virus u otros agentes infecciosos se deben considerar a la luz de nuevos conocimientos que surjan sobre agentes infecciosos y a la disponibilidad de métodos de análisis apropiados.

21. Los rótulos de de cada unidad de plasma almacenadas para la constitución de la mezcla y fraccionamiento deben cumplir con las disposiciones de la monografía “Plasma humano para fraccionamiento” de Farmacopea Argentina (u otras farmacopeas internacionalmente reconocidas) y deben exhibir, al menos, el número de identificación de la donación, el nombre y el domicilio del centro de donación o las referencias del servicio de transfusión de sangre responsable de la preparación, el número de lote del recipiente, la temperatura de almacenamiento, el volumen total o peso del plasma, el tipo de anticoagulante empleado y la fecha de extracción y/o separación.

22. Con fin de minimizar la contaminación microbiológica o la introducción de material extraño del plasma destinado al fraccionamiento, el descongelamiento y la constitución de la mezcla inicial, se debe realizar en un área limpia al menos grado D, usando la vestimenta adecuada, máscaras faciales y guantes. Se deben controlar regularmente los métodos para la apertura de las bolsas, la constitución de la mezcla y el descongelamiento, por ej. analizando la carga biológica. Para todas las otras manipulaciones abiertas, los requerimientos de las áreas limpia deben ser acordes con los requisitos del Anexo 1 de la guía para BPF.

23. Deben existir métodos para distinguir claramente entre medicamentos o productos intermedios que hayan sido sometidos a un proceso de eliminación o inactivación viral, de los que no lo hayan hecho.

24. La validación de los métodos empleados en la remoción o inactivación viral no debe realizarse en las instalaciones de producción, a fin de evitar cualquier riesgo de contaminación de la fabricación habitual con virus utilizados para la validación.

CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

25. De ser posible, se deben almacenar muestras de donaciones individuales a los efectos de facilitar cualquier procedimiento de revisión necesario. Por

lo general, dicho almacenamiento, corresponde al centro de donación. Las muestras de cada mezcla de plasma se deben almacenar en condiciones adecuadas durante al menos un año después de la fecha de vencimiento del producto terminado con la vida útil más extensa.

ELIMINACIÓN DE LA SANGRE, EL PLASMA O LOS PRODUCTOS INTERMEDIOS RECHAZADOS

26. Debe existir un procedimiento operativo estándar para la eliminación segura y eficaz de la sangre, el plasma o los productos intermedios rechazados.

ANEXO 15

CALIFICACIÓN Y VALIDACIÓN

PRINCIPIO

1.- El presente anexo describe los principios de calificación y validación aplicables a la fabricación de medicamentos. Las Buenas Prácticas de Fabricación proponen que los fabricantes identifiquen las tareas de validación que son necesarias para demostrar el control de los aspectos críticos de sus operaciones en particular. Se debe validar/calificar todo cambio significativo en las instalaciones, equipos y procesos que pueda influir en la calidad del producto. Se debe emplear un enfoque de análisis de riesgo para determinar el alcance y la duración de la validación.

PLANIFICACIÓN DE LA VALIDACIÓN

2.- Todas las actividades de validación deben estar planificadas. Los elementos claves del programa de validación deben estar claramente definidos y documentados en un plan maestro de validación (PMV) o documentos equivalentes.

3.- El PMV de validación debe ser un documento resumido, es decir, breve, conciso y claro.

4.- El PMV debe contener como mínimo datos sobre los siguientes aspectos:

(a) política de validación;

(b) estructura organizativa de las actividades de validación;

(c) resumen de instalaciones, sistemas, equipos y procesos a ser validados;

(d) formato de la documentación: el formato a ser usado para los protocolos e informes;

(e) planificación y cronograma;

(f) control de cambio;

(g) referencia a documentos anteriores;

5.- Cuando se trate de proyectos grandes puede ser necesario diseñar planes maestros de validación independientes.

DOCUMENTACIÓN

6.- Se debe elaborar un protocolo escrito en el que se especifique como se llevar a cabo la calificación y la validación. Este protocolo debe ser revisado y aprobado. Además, debe especificar las etapas fundamentales y los criterios de aceptación.

7.- Se debe preparar un informe que incluya referencias a los protocolos de calificación y/o validación, resumiendo los resultados obtenidos, comentarios de los desvíos observados y las respectivas conclusiones, incluyendo recomendaciones sobre los cambios necesarios para corregir las deficiencias. Todo cambio en el plan tal como se ha definido en el protocolo debe documentarse y justificarse.

8.- Luego de concluida una etapa de calificación satisfactoriamente, debe realizarse una aprobación formal para la siguiente etapa de la calificación y validación mediante una autorización por escrito.

CALIFICACIÓN

Calificación del Diseño

9.- La calificación del diseño (CD) es el primer elemento de la validación de nuevas instalaciones, sistemas o equipos.

10.- Se debe demostrar y documentar la adecuación del diseño a las Buenas Prácticas de Fabricación

Calificación de la Instalación

11. - En caso de instalaciones, sistemas y equipos nuevos o modificados se debe realizar la calificación de la instalación (CI)

12.- La calificación de la instalación debe incluir, pero no limitarse, lo siguiente:

a) comprobación de que la instalación de equipos, tuberías, servicios e instrumental está conforme con los esquemas y especificaciones de ingeniería actualizados;

b) recopilación y compaginación de las instrucciones de operación y funcionamiento suministradas por el proveedor y de los requerimientos de mantenimiento;

c) requisitos de calibración;

d) verificación de los materiales de construcción.

Calificación en Operación

13.- La calificación en operación (CO) debe realizarse posteriormente a la calificación de la instalación.

14.- La calificación en operación debe incluir, pero no limitarse, lo siguiente:

a) ensayos que se hayan desarrollado a partir del conocimiento de los procesos, sistemas y equipos;

b) ensayos que incluyan una situación o un conjunto de ellas que abarquen los límites máximos y mínimos de trabajo, condiciones generalmente denominadas “peor caso”.

15.- La finalización de la calificación en operación de forma satisfactoria debe permitir completar los procedimientos de calibración, operación y limpieza, el entrenamiento del operador y los requerimientos de mantenimiento preventivo. Ello debe permitir la «liberación» formal de las instalaciones, sistemas y equipos

Calificación de Desempeño

16.- La calificación del desempeño/performance (CP/PQ) debe efectuarse una vez finalizada satisfactoriamente las calificaciones de instalación y en operación.

17.- La calificación del desempeño debe incluir, pero no limitarse, lo siguiente:

a) ensayos, empleando materiales de producción, sustitutos calificados o productos simulados, que se hayan desarrollado a partir del conocimiento de los procesos y las instalaciones, sistemas o equipos;

b) ensayos que incluyan una situación o un conjunto de ellas que abarquen los límites máximos y mínimos de operación.

18.- Aunque la calificación de desempeño se describe como una actividad independiente, en ciertos casos puede ser apropiado realizarla junto con la calificación de la operación (CO).

Calificación de las instalaciones, sistemas y equipos en uso

19.- Se deben ofrecer pruebas que respalden y verifiquen los parámetros y límites de operación para las variables críticas del equipo en funcionamiento. Además, se debe documentar la calibración, la limpieza, el mantenimiento preventivo, los procedimientos de operación y los procedimientos con los registros de capacitación del operador.

VALIDACIÓN DE PROCESOS

Consideraciones Generales

20.- Los requerimientos y principios descriptos en este capítulo son aplicables a la elaboración de formas farmacéuticas. Comprenden la validación inicial de los nuevos procesos, la validación posterior a la modificación de un proceso y la revalidación.

21.- La validación debe completarse antes de la distribución y venta del medicamento (validación prospectiva). En circunstancias excepcionales, cuando esto no sea posible, puede ser necesario validar los procesos durante la producción habitual (validación concurrente). Asimismo, deben validarse los procesos utilizados durante cierto tiempo (validación retrospectiva).

22.- Las instalaciones, sistemas y equipos a utilizarse deben estar calificados y los métodos analíticos deben estar validados previamente. El personal que participe en la validación deben haber recibido la capacitación necesaria.

23. Las instalaciones, sistemas, equipos y procesos se deben evaluar periódicamente para verificar que su funcionamiento sigue siendo válido.

Validación prospectiva

24. La validación prospectiva debe incluir pero no limitarse, lo siguiente:

a) breve descripción del proceso;

b) resumen de los pasos críticos del proceso a ser investigado;

c) listado de instalaciones y equipos a ser utilizados (incluyendo el equipamiento de medición / control / registro) junto con el estado de calibración;

d) especificaciones de liberación del producto terminado;

e) listado de métodos analíticos, según corresponda;

f) propuesta de controles en proceso con los criterios de aceptación;

g) ensayos adicionales a realizarse con criterios de aceptación y validación analítica, según corresponda;

h) plan de muestreo;

i) métodos de registro y evaluación de resultados;

j) funciones y responsabilidades;

k) cronograma propuesto.

25. Mediante el proceso así definido (incluidos los items especificados) se puede producir una serie de lotes del producto final en las condiciones de

producción habituales. En teoría, el número de repeticiones del proceso y de observaciones realizadas debe ser suficiente para establecer el margen normal de variación y las tendencias y suministrar datos suficientes para la evaluación. Para la validación de un proceso de elaboración son necesarios al menos tres lotes/repeticiones consecutivos del proceso que cumplan consistentemente con los parámetros establecidos.

26. Los lotes elaborados para la validación de los procesos deben ser del mismo tamaño que los lotes previstos a escala industrial.

27. Si los lotes empleados para la validación están destinados a su venta o suministro, las condiciones de producción deben cumplir plenamente con las exigencias de las Buenas Prácticas de Fabricación, incluido el resultado satisfactorio del ejercicio de validación, y las de la autorización de comercialización.

Validación concurrente

28. En circunstancias excepcionales, puede aceptarse no completar el programa de validación antes de dar comienzo a la producción habitual

29. La decisión de desarrollar la validación concurrente debe estar justificada, documentada y aprobada por personal autorizado.

30. La documentación requerida para la validación concurrente es la misma que para la validación prospectiva.

Validación retrospectiva

31. La validación retrospectiva sólo es aceptable en los casos de procesos ya establecidos y se considera inapropiada cuando hayan existido cambios recientes ya sea en la composición del producto, los procedimientos operativos o el equipamiento.

32. La validación de dichos procesos se debe basar en datos históricos. Los pasos abarcan la preparación de un protocolo específico, el informe de resultados y la revisión de los mismos, la conclusión obtenida y una recomendación.

33. La fuente de los datos empleados para esta validación deben incluir, pero no limitarse, los registros de lotes (procesamiento y acondicionamiento), tablas de control de procesos, registros de mantenimiento, historial de cambios de personal, estudios de adecuación de proceso y datos del producto terminado incluyendo cuadros de tendencia y resultados de los estudios de estabilidad.

34. Los lotes seleccionados para la validación retrospectiva deben ser representativos de todos los lotes fabricados durante el período de revisión, incluyendo los lotes que no cumplieron con las especificaciones y su número debe ser suficiente para demostrar la consistencia del proceso. Pueden necesitarse ensayos adicionales de las muestras conservadas, a fin de obtener la cantidad y tipo de datos necesarios para validar el proceso retrospectivamente.

35. En la validación retrospectiva se deben analizar datos de diez a treinta lotes consecutivos para evaluar la consistencia del proceso.

VALIDACIÓN DE LIMPIEZA

36. Se debe realizar la validación de limpieza a fin de confirmar la efectividad del procedimiento de limpieza. El criterio para determinar los límites de residuos de productos, agentes de limpieza y contaminación microbiana se deben basar, lógicamente, en los materiales implicados. Los límites deben ser posibles de alcanzar y verificar.

37. Se deben utilizar métodos analíticos validados con sensibilidad para detectar residuos o contaminantes. El límite de detección de cada método analítico debe ser lo suficientemente sensible para detectar el nivel aceptado establecido para el residuo o contaminante.

38. Es preciso validar los procedimientos de limpieza de las superficies del equipo que entran en contacto directo con el producto. Sin embargo deben considerarse las partes del equipo que no entren en contacto con el mismo. Asimismo, se deben validar los intervalos entre el uso y la limpieza, como así también entre ésta, y la reutilización del equipo. Deben determinarse los intervalos y métodos de limpieza.

39.- En caso de procedimientos de limpieza para productos y procesos similares, se considera aceptable seleccionar una gama representativa de productos y procesos parecidos. Se podrá realizar un único estudio de validación que siga el método del «peor caso» y tenga en cuenta todos los aspectos críticos.

40.- Para demostrar que el método está validado se deben efectuar al menos tres ejecuciones consecutivas del procedimiento de limpieza con resultados satisfactorios.

41. El método “ensayar hasta que esté limpio” no se considerado una alternativa apropiada para la validación de limpieza.

CONTROL DE CAMBIOS

42. Se deben implementar procedimientos escritos para describir las acciones a tomar cuando se propone un cambio en un material de partida, de acondicionamiento de producto, equipamiento del proceso, entorno ambiental del proceso (o área), método de producción o de análisis o cualquier otro cambio que pudiera afectar la calidad del producto o la reproducibilidad del proceso. Los procedimientos de control de cambios deben asegurar que se generen suficientes datos para demostrar que el proceso modificado resultará en un producto de la calidad deseada, en conformidad con las especificaciones aprobadas.

43. Todos los cambios que pudieran afectar la calidad del producto o la reproducibilidad del proceso se deben solicitar, documentar y aceptar formalmente. Se debe evaluar el impacto que podría provocar en el producto los cambios en las instalaciones, los sistemas y el equipamiento, incluyendo un análisis de riesgo. Se debe determinar la necesidad y el grado de recalificación y revalidación.

REVALIDACIÓN

44.- Se deben evaluar periódicamente las instalaciones, los sistemas, el equipamiento y los procesos, incluyendo la limpieza, a fin de confirmar que continúan siendo válidos. Cuando no se hayan producido cambios significativos respecto al estado validado, la necesidad de revalidación se cubrirá con una revisión documentada que demuestre que las instalaciones, sistemas, equipos y procesos cumplen con los requerimientos establecidos.

GLOSARIO

A continuación se detallan las definiciones de los términos relacionados con la calificación y validación utilizados en este Anexo, no encontrados en el glosario general de la Norma de BPF.

Análisis de riesgo - Método que evalúa y caracteriza los parámetros críticos de la funcionalidad de un equipamiento o proceso.

Calificación de Diseño (CD) - Verificación documentada de que el diseño propuesto para las instalaciones, los sistemas y el equipamiento es apto para el fin pretendido.

Calificación de Instalación (CI) - Verificación documentada de que las instalaciones, los sistemas y el equipamiento, tal como están instalados o modificados, cumplen con el diseño aprobado y las recomendaciones del fabricante.

Calificación de Operación (CO) - Verificación documentada de que las instalaciones, los sistemas y el equipamiento, tal como están instalados o modificados, operan de la manera pretendida en todas las situaciones de operación previstas.

Calificación de Desempeño o Performance (CP) - Verificación documentada de que las instalaciones, los sistemas y el equipamiento, en el conjunto, funcionan efectivamente y de manera reproducible, basados en los métodos de proceso aprobados y especificaciones del producto terminado.

Control de Cambios - Sistema formal por el que representantes calificados de las disciplinas correspondientes revisan las modificaciones propuestas o realizadas que podrían afectar la condición validada de las instalaciones, los sistemas, los equipos o procesos. Su objetivo es determinar la necesidad de acción para garantizar y documentar que el sistema se mantiene en un estado validado.

Peor Caso - Condición o conjunto de condiciones que abarcan los límites máximos y mínimos de elaboración y las circunstancias, de acuerdo a procedimientos operativos estándares, que representan la mayor posibilidad de falla en el producto o proceso, en comparación con las condiciones ideales. Dichas condiciones no inducen necesariamente fallas en el producto o proceso.

Producto simulado - Material que en sus características físicas y, cuando corresponda, químicas (por ej. viscosidad, tamaño de partícula, pH, entre otros) se asemeja al producto objeto de validación. En muchos casos, estas características las puede cumplir un lote de producto placebo.

Revalidación - Repetición de la validación del proceso que proporciona la seguridad de que las modificaciones en el proceso o equipamiento introducidas de acuerdo con los procedimientos de control de cambios no afectan de manera adversa las características del proceso y calidad del producto.

Sistema - Conjunto de equipos con un fin en común.

Validación Concurrente - Validación llevada a cabo durante la elaboración habitual de productos destinados a la venta.

Validación de Limpieza - La validación de limpieza constituye la evidencia documentada de que un procedimiento de limpieza aprobado mantendrá el equipamiento en condiciones adecuadas para la elaboración de medicamentos.

Validación del Proceso - Evidencia documentada de que el proceso realizado de la manera preestablecida funciona de manera efectiva y reproducible para la elaboración de un medicamento que cumpla con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

Validación Prospectiva - Validación llevada a cabo antes de la producción habitual de productos destinados a la venta.

Validación Retrospectiva - Validación de un proceso en función de un producto ya comercializado basada en la acumulación de datos de elaboración, análisis y de registros de control de lote.

ANEXO 16

NORMAS PARA LA IDENTIFICACIÓN POR COLORES DE ENVASES DE LAS DROGAS DE USO ANESTESIOLÓGICO Y DE LAS SOLUCIONES PARENTERALES

1. Introducción

PRINCIPIO

1.1 Considerando que la falta de identificación por color de envases de drogas de uso anestesiológico y soluciones parenterales constituyen un potencial peligro para la vida del paciente, es indispensable establecer un sistema que contribuya a la correcta identificación de las drogas de uso anestesiológico por grupo de acción.

1.2 El objetivo del presente anexo es disminuir el riesgo durante los procedimientos de anestesia y de aplicación de soluciones parenterales mediante la identificación inequívoca de los productos farmacéuticos utilizados en anestesióloga.

1.3 Todos los envases deben contener la información requerida según lo indicado en las BPF y cumplir con la Normativa Nacional vigente al respecto.

2. Identificación de envases de uso anestesiológico

2.1 En los envases de las drogas de uso anestesiológico, los rótulos deben estar identificados con dos bandas horizontales que cubrirán, al menos, hasta 300º de la circunferencia del envase.

2.2 Dichas bandas deben estar ubicadas una en el extremo superior y otra en el inferior, situando la leyenda entre las mismas.

2.3 La/las bandas anchas medirán 3 mm y la/las bandas finas medirán 1 mm. Las bandas deberán estar libres de inscripciones.

2.4 Los envases de las drogas de uso anestesiológico deben ser identificados con bandas de los siguientes colores, según la acción farmacológica, de la siguiente forma:

- Drogas vasculotrópicas cardiovasculares: dos bandas anchas de Color Pantone Rojo Básico. Ej.: Efedrina, Etilefrina, Metaraminol, Adrenalina, Dobutamina, Dopamina, Isoprotenerol, Fenilefrina, Noradrenalina, Nitroglicerina, Nitroprusiato de Sodio.

- Procaína al 50 %: dos bandas anchas de Color Pantone Rojo Básico y Calavera con dos tibias cruzadas, del mismo color que las bandas.

- Drogas relajantes musculares periféricas: dos bandas anchas de Color Pantone Verde Básico y una Calavera con dos tibias cruzadas, del mismo color que las bandas.

- Opiodes y sus derivados: dos bandas anchas de Color Pantone Negro Básico.

- Fármacos analgésicos no esteroides (A.I.N.E.): dos bandas finas de Color Pantone Negro.

- Combinación de opiodes y A.I.N.E.: una banda ancha superior Color Pantone Negro Básico y una banda fina inferior del mismo color que la banda ancha.

- Atropina: dos bandas anchas de Color Pantone Blanco Básico, delimitadas de la siguiente manera, la banda superior con una línea negra menor a 1 mm en el borde inferior y la banda inferior con una línea negra menor a 1 mm en el borde superior.

- Fármacos inductores anestésicos: dos bandas anchas de Color Pantone Amarillo Básico. Ej.: Tiopental Sódico, Propofol, Midazolam, Ketamina, Propanidida y Etomidato.

- Fármacos antagonistas: dos bandas anchas de Color Pantone Naranja Básico. Ej.: Neostigmina, Flumazenil, Naxolona.

- Aquellas drogas comprendidas en dos o más grupos citados: dos bandas anchas Color Pantone Celeste Básico. Ej.: Clonidina, Dexmedetomidina.

2.5 Cualquier otro medicamento que deba estar presente en las áreas donde se realizan anestesias y que contenga una droga que produzca una acción terapéutica diferente a las indicadas en el ítem anterior, ej.:antibióticos, anestésicos locales, drogas hipotensores, diuréticos, antiinflamatorios esteroides, etc., deberán cumplir con la guía de rotulado de acuerdo a lo especificado en el punto 4. De acuerdo a las guías que al respecto se dicten en el futuro, podrán ser identificadas con el código de colores, no pudiendo ser aplicados en forma de bandas horizontales ya sean superiores, inferiores o ambas, consignadas en el punto 3 de este anexo.

2.6 Si en el futuro surgieran nuevas drogas de uso anestesiológico se ubicaran en el grupo correspondiente con el color asignado en este anexo.

3. Identificación por colores de las soluciones parenterales

3.1 Los rótulos en los envases de las soluciones parenterales de gran volumen deben cumplir con la doble inscripción que permita la lectura en la posición en que el envase es abierto y, así mismo, se pueda leer en la posición de la solución mientras se administra. El rótulo permanente que permite la

lectura en la posición de administración, deberá cumplir lo indicado en el punto 5 y el rótulo que permite la lectura en la posición en la cual el envase es abierto, debe ser desprendible, cumpliendo lo especificado en el punto 4.

3.2 Las inscripciones y los espacios entre estas, tanto en el rotulado permanente como en el desprendible autoadhesivo, deberán ser no menores a las consignadas en el punto 4 y 5, guardando las mismas proporciones y resaltados, pudiendo ser mayores adaptándose, en este último caso, al tamaño del envase.

3.3 Los rótulos en los envases primarios de los productos deben estar identificados con los siguientes colores:

- Dextrosa al 5 %: dos bandas de Color Pantone Púrpura Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.
- Dextrosa al 10 %: cuatro bandas de Color Pantone Púrpura Básico, dos superiores y dos inferiores, de 3 mm de ancho cada una y el intervalo entre las bandas no debe ser menor de 1 mm.
- Dextrosa al 25 %: seis bandas de Color Pantone Púrpura Básico, tres superiores y tres inferiores, de 3 mm de ancho cada una y el intervalo entre las bandas no debe ser menor de 1 mm.
- Dextrosa al 50 %: ocho bandas de Color Pantone Púrpura Básico, cuatro superiores y cuatro inferiores, de 3 mm de ancho cada una y el intervalo entre las bandas no debe ser menor de 1 mm.
- Solución fisiológica de Cloruro de Sodio: dos bandas de color Pantone Azul Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.
- Solución fisiológica de Cloruro de Sodio al 20 %, ampollas: cuatro bandas de color Pantone Azul Básico, dos superiores y dos inferiores, de 3 mm de ancho cada una y el intervalo entre las bandas no debe ser menor de 1 mm.
- Solución de Cloruro de Potasio, ampollas: dos bandas de color Pantone Rojo Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.
- Solución molar de Cloruro de Potasio: cuatro bandas de color Pantone Rojo Básico, dos superiores y dos inferiores, de 3 mm de ancho cada una y el intervalo entre las bandas no debe ser menor de 1 mm.
- Agua para Inyectables: dos bandas de color Pantone Naranja Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.
- Solución Ringer: dos bandas de color Pantone Negro Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.
- Solución Ringer Lactato: dos bandas de color Pantone Marrón Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.
- Solución molar de Bicarbonato de Sodio, envase: dos bandas de color Pantone Verde Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.
- Solución Manitol al 15 %: dos bandas de color Pantone Celeste Básico, una superior y otra inferior, de 3 mm de ancho cada una.

4. Características de los rótulos desprendibles y autoadhesivos

Los rótulos deben ser fácilmente desprendibles del envase primario, de modo que puedan adherirse a la historia clínica o a la ficha de registro de variables anestésicas. Los mismos, deberán cumplir con lo siguiente:

4.1 El fondo del rótulo debe ser blanco opaco o semimate y el texto deberá consignarse en color negro.

4.2 El tamaño del envase debe guardar relación con el tamaño del rótulo necesario para el contenido de lo especificado en esta guía, según el caso que correspondiera.

4.3 el tamaño mínimo de la letra será de 2 mm, Color Pantone Negro Básico, sugiriendo tipo de letra arial normal (no negrita) para todos los textos, exceptuando el del nombre genérico de la droga y su concentración.

4.4 El nombre genérico de la droga y su concentración deben imprimirse en letra no menor de 3 mm de altura (no deben ser del tipo de letra arial, si hubiera sido el elegido de acuerdo al consignado en el punto 4.3) en negrita, destacándose por sobre el nombre de fantasía, del laboratorio productor y las demás inscripciones del rótulo. Dicha inscripción debe guardar una distancia de 1 mm o más, respecto al margen superior del rótulo o de la banda, en el caso que correspondiera y de 1 mm o más, respecto de la escritura que en el renglón inferior siguiente se consigne.

4.5 En cada rótulo debe incluirse: la cantidad total de la droga, su concentración, el contenido expresado en ml, la vía de administración, el número de lote, la aprobación por el Ministerio de Salud y la fecha de

vencimiento legible y no codificada que deben inscribirse en diferente tipo de letra que la elegida para el punto 4.4. Las separaciones entre inscripciones deben ser de 0,5 mm o más.

4.6 No se aceptarán, abreviaturas, ni números romanos ni el signo arroba (@) ni otro código ascii en el rótulo.

4.7 cuando se trate de magnitudes expresadas en decimales, el cero debe preceder siempre a las magnitudes inferiores a uno separado por una coma y nunca se debe utilizar un cero al final.

4.8 No se aceptarán en los rótulos de los envases primarios leyendas tales como: estéril, libre de pirógenos, fecha de envasado, requerimientos de almacenamiento o leyendas tales como “puede crear hábito” o ninguna otra que no fueran las consignadas en los puntos 4 y 5 de este anexo.

4.9 La totalidad de la información contenida en los rótulos deberá escribirse en idioma español.

4.10 El orden del arte e inscripciones del rótulo debe ser el siguiente: desde la porción superior en la que debe figurar la banda de color identificatoria, en los casos que corresponda, debajo de esta o a partir del margen superior en los casos que no lleven banda superior, debe figurar: el nombre genérico de la droga y su concentración de acuerdo al punto 4.4, debajo de esta la vía de administración, debajo de esta la fecha de vencimiento, debajo de esta el volumen total y la cantidad de la droga, debajo de esta el nombre de fantasía, debajo de esta el nombre del laboratorio, debajo de esta el número de lote, debajo de esta el número de aprobación del Ministerio de Salud.

4.11 La identificación por color de los rótulos de los envases de las drogas de uso anestesiológico y de las soluciones parenterales, debe cumplir con lo determinado en los puntos 2 y 3 respectivamente.

4.12 Se deberá insertar en cada rótulo, el código de barra correspondiente en el margen derecho y en posición vertical, el cual no afectará la legitimidad de la información del rótulo y debe contener la misma información que el mismo, pudiendo ser traducidos por un lector óptico, para lo cual es imprescindible la estandarización de los mismos, entre los laboratorios productores.

4.13 Las tintas utilizadas en la impresión del rótulo, debe de ser del tipo indeleble, de forma tal que tanto el adhesivo, como la humedad, no puedan alterarlas.

4.14 Los rótulos deben estar fijados a los envases con un adhesivo que permita retirarlos de los mismos sin que se rompan, para permitir fijarlos posteriormente a las historias clínicas o a las fichas de registros de las variables anestésicas, diseñados de tal manera que impidan su desprendimiento de las mismas, sin producir alteraciones en el lugar de fijación en la historia clínica.

5. Rotulado de los envases primarios de las drogas de uso en Unidad de Terapia Intensiva (UTI), Unidad Coronaria (UCO), trauma, cirugía y en las áreas donde se realizan anestesias

Todas las drogas que ingresen a dichas áreas y que no hubieran sido consignadas en los puntos 3 y 4, deben cumplir con los requerimientos indicados para rótulos desprendibles del envase y autoadhesivos consignados en el punto 4.

ANEXO 17

LIBERACIÓN PARAMÉTRICA

PRINCIPIO

1. Es un sistema de liberación que ofrece la garantía de que el producto liberado es de la calidad deseada basándose en la información recogida durante el proceso de fabricación y en el cumplimiento de exigencias específicas de las Buenas Prácticas de Fabricación relacionadas con la liberación paramétrica

2. La liberación paramétrica se debe cumplir con las exigencias básicas de las Buenas Prácticas de Fabricación, un sistema de Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de Control (HACCP) implementado, los anexos aplicables y las directrices incluidas en el presente anexo. Las empresas deben ser autorizadas por la ANMAT para tal fin.

LIBERACIÓN PARAMÉTRICA

3. Se acepta que un conjunto completo de evaluaciones y controles en proceso puede proporcionar mayor seguridad que el producto terminado cumpla con las especificaciones en comparación del control de esterilidad sobre el producto terminado.

4. La autorización de la liberación paramétrica debe ser concedida, denegada o retirada por la Autoridad Sanitaria Nacional para cada Lote de producto

5. La liberación paramétrica se debe practicar en presencia, supervisión y aprobación de una comisión de inspectores de Buenas Prácticas de Fabricación

LIBERACIÓN PARAMÉTRICA DE PRODUCTOS ESTÉRILES

6. Esta sección sólo aplica a la parte de Liberación Paramétrica relacionada con la liberación rutinaria de productos terminados sin llevar a cabo el ensayo de esterilidad. La eliminación del test de esterilidad sólo es válida si se basa en una demostración certera de que las condiciones predeterminadas y validadas de esterilización se han alcanzado.

7. El Laboratorio debe contar con un sistema de aseguramiento de la esterilidad según se detalla en el glosario del presente anexo.

8. Debido a las limitaciones estadísticas del método, el ensayo de esterilidad solo proporciona la oportunidad de detectar una falla importante del sistema de aseguramiento de la esterilidad.

9. Se puede autorizar la liberación paramétrica si se dispone de los datos que avalan el correcto procesamiento del lote y proporcionen por sí solos suficiente seguridad de que se ha cumplido el proceso diseñado y validado para asegurar la esterilidad.

10. En la actualidad se puede autorizar la liberación paramétrica únicamente para productos esterilizados en forma terminal en su envase final.

11. Es poco probable que un producto completamente nuevo sea considerado adecuado para la Liberación Paramétrica, porque como parte de los criterios de aceptación se debe incluir un período de resultados de ensayos de esterilidad satisfactorios. Pueden existir casos en los que el nuevo producto sea, desde el punto de vista del aseguramiento de la esterilidad, sólo una variación menor de otros productos y que los datos de los ensayos de esterilidad existentes de dichos productos puedan considerarse aplicables.

12. Debe estar implementado un sistema de Análisis de Riesgo y Puntos Críticos de Control (HACCP) en el sistema de aseguramiento de la esterilidad enfocado en una evaluación de la aprobación como si se tratara de productos no esterilizados

13. El elaborador debe poseer un historial de buen cumplimiento de las BPF.

14. Al momento de evaluar el cumplimiento de las BPF se deben tener en cuenta el historial de la no esterilidad de los productos y los resultados de los ensayos de esterilidad efectuados en el producto en cuestión, conjuntamente con los productos procesados con el mismo sistema de aseguramiento de la esterilidad o, uno similar.

15. Un ingeniero calificado y especializado en aseguramiento de la esterilidad y un profesional calificado en microbiología deben encontrarse presentes en el sitio de producción y esterilización.

16. El diseño y la validación original del producto debe asegurar que se mantenga la integridad bajo todas las condiciones relevantes.

17. El sistema de control de cambios debe requerir la revisión de los cambios por parte del personal de aseguramiento de la esterilidad.

18. Debe existir un sistema para el control de la contaminación microbiana en el producto antes de la esterilización.

19. No debe existir ninguna posibilidad de confusión ni mezcla entre los productos esterilizados y los productos no esterilizados. Tal

seguridad debe garantizarse mediante barreras físicas o sistemas electrónicos validados.

20. Debe verificarse que los registros de esterilización cumplan con las especificaciones mediante al menos dos sistemas independientes. Dichos sistemas pueden constar de dos personas o un sistema informático validado más una persona.

21. Antes de liberar cada lote de producto se deben confirmar los siguientes puntos adicionales:

1. Se han efectuado todas las tareas de mantenimiento y todos los controles de rutina planificados en el esterilizador empleado.
2. Todas las reparaciones y modificaciones han sido aprobadas por el ingeniero de aseguramiento de la esterilidad y el microbiólogo.
3. Todos los instrumentos se encontraban con la calibración vigente.
4. El esterilizador se encontraba validado para la carga de producto procesada
5. La descripción del proceso de esterilización incluyendo el tipo de ciclo, plantilla de registro, especificaciones de los parámetros del ciclo (tiempo, temperatura, presión, Fo) e indicadores químicos.
6. Las especificaciones y métodos o procedimientos aplicados para los controles en proceso: pre-esterilización, carga microbiana inicial, monitoreo de los parámetros del ciclo de esterilización, verificación del registro de esterilización y aquellos que se consideren necesarios de acuerdo al producto y método de esterilización.

22. Una vez autorizada la liberación paramétrica, las decisiones para la liberación o rechazo de un lote se deben basar en las especificaciones aprobadas. El incumplimiento de las especificaciones para la liberación paramétrica no puede compensarse realizando un ensayo de esterilidad satisfactorio.

GLOSARIO

Liberación paramétrica - Sistema de liberación que asegura que el producto presenta la calidad pretendida, basado en la información recabada durante el proceso de elaboración y en el cumplimiento con los requerimientos de las BPF específicos relacionados con la Liberación Paramétrica.

Sistema de Aseguramiento de la Esterilidad - Suma de todas las gestiones efectuadas para asegurar la esterilidad de los productos. Para los productos esterilizados en forma terminal, dichas gestiones incluyen las siguientes etapas:

1. Diseño del producto
2. Conocimiento y control de la condición microbiológica de los materiales de partida y coadyuvantes de procesos (como gases y lubricantes).
3. Control de la contaminación del proceso de elaboración a fin de evitar el ingreso de microorganismos y su multiplicación en el producto. Este objetivo se puede lograr mediante la limpieza y sanitización de las superficies en contacto con el producto, la prevención de la contaminación del ambiente por el manipuleo en áreas limpias, el uso de límites de tiempo en los controles de procesos y, de corresponder, en las etapas de filtración.
4. Prevención de mezcla entre productos esterilizados y no esterilizados.
5. Mantenimiento de la integridad del producto.
6. El proceso de esterilización.
7. La totalidad del Sistema de Calidad que contiene al Sistema de Aseguramiento de la Esterilidad, por ej. control de cambios, capacitación, procedimientos escritos, controles de liberación, mantenimiento preventivo planificado, análisis en modo de fallos, sistema de análisis de riesgo y puntos críticos de control, prevención de errores humanos, calibración, validación, entre otros.

ANEXO 18

MUESTRAS DE RETENCIÓN

1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

1.1 El presente anexo de las Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos, sirve de orientación sobre la toma y conservación de muestras de retención de materiales de partida, materiales de acondicionamiento y de productos terminados.

1.2 Los requisitos específicos para medicamentos de investigación, figuran en el Anexo 13 de la presente Normativa.

1.3 Este anexo también se aplica para la toma de muestras de retención de medicamentos importados.

2. PRINCIPIO

2.1 Las muestras son conservadas con la finalidad de cumplir dos propósitos: en primer lugar para tener muestras para pruebas analíticas y en segundo lugar proporcionar muestras del producto totalmente terminado.

Muestra de retención: es una muestra de un lote de material de partida, material de acondicionamiento o de producto terminado que se conserva con el propósito de ser analizada/o, si es necesario, o servir de referencia con fines de identificación, por ejemplo: presentación, acondicionamiento, etiquetado, prospecto, número de lote, fecha de vencimiento, entre otros.

2.2 Es necesario que el titular de una autorización de comercialización o el importador, mantengan las muestras de retención de cada lote de producto terminado, así como de los materiales de partida.

2.3 Las muestras de retención sirven como un modelo del lote de producto terminado o de los materiales de partida y pueden ser evaluadas en el caso de, por ejemplo, un reclamo en relación a la calidad de la forma farmacéutica, una consulta en relación con el cumplimiento de autorización de comercialización, consulta sobre el etiquetado /acondicionamiento o un reporte de farmacovigilancia.

2.4 Se deben conservar registros de trazabilidad de las muestras y estar disponibles para revisión por las autoridades competentes.

3. TIEMPO DEL ALMACENAMIENTO

3.1 Las muestras de retención de cada lote de producto terminado deben ser conservada durante al menos un año después de la fecha de vencimiento.

3.2 Las muestras de materiales de partida (que no sean disolventes, gases o agua utilizados en el proceso de fabricación) se deben conservar hasta un año después del vencimiento del último lote de producto elaborado con dicho material de partida.

4. TAMAÑO DE LAS MUESTRAS DE RETENCION

4.1 La muestra de retención debe conservarse en cantidad suficiente que permita llevar a cabo, al menos en tres ocasiones, los ensayos analíticos completos del lote, de acuerdo con la documentación de registro de producto que ha sido evaluada y aprobada por la Autoridad Sanitaria Competente.

4.2 Las muestras de retención deben ser representativas del lote de material de partida o producto terminado del que se tomen.

5. CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

5.1 Las condiciones de almacenamiento deben estar en conformidad con el registro de aprobación del producto y modificaciones posteriores. (por ejemplo, almacenamiento refrigerado si corresponde)

Nota: en caso de materiales de acondicionamiento de gran tamaño que no puedan ser conservados dentro del registro de acondicionamiento de lote, deben ser almacenados junto con las muestras de retención en su correspondiente sector.

6. MUESTRAS DE RETENCIÓN EN EL CASO DE CIERRE DE UN LABORATORIO FABRICANTE O IMPORTADOR.

6.1 Cuando un laboratorio fabricante o importador cesa en sus actividades definitivamente y su autorización es cedida, revocada o suspendida, es probable que sigan en el mercado muchos lotes de medicamentos fabricados o importados por ese laboratorio que no hayan vencido. Para que esos lotes puedan seguir en el mercado, el laboratorio fabricante o importador deberá tomar medidas concretas para la transferencia de las muestras de retención (y la documentación pertinente a efectos de BPF) a instalaciones autorizadas para su custodia y/o análisis. El fabricante o importador debe demostrar a las Autoridades Sanitarias Competentes que los acuerdos para el almacenamiento son satisfactorios y que las muestras están disponibles para su análisis en caso de necesidad.

1025. BUENAS PRÁCTICAS PARA LA MANIPULACIÓN DE MEDICAMENTOS CITOSTÁTICOS ENDOVENOSOS EN CENTROS ASISTENCIALES

CONSIDERACIONES GENERALES

Los medicamentos citostáticos actúan alterando la capacidad de división celular en forma no selectiva, afectando las células tumorales y también interfiriendo en los circuitos bioquímicos de las células normales, en especial en los tejidos con mayor recambio celular, como por ejemplo, piel, medula ósea, epitelio del tracto gastrointestinal, folículos pilosos y estructuras embrionarias.

La eficacia de la terapia oncológica con fármacos plantea diversos inconvenientes tal como la toxicidad elevada que se manifiesta incluso cuando la aplicación terapéutica es correcta y puede conducir a consecuencias graves si se verifican errores en la dosis, o en el proceso de reconstitución y administración o contaminación por manipuladores.

La mayoría de los tratamientos farmacológicos consisten en una terapéutica combinada con efecto sinérgico de los distintos principios activos citostáticos, con diferente toxicidad, dosis limitante y menor posibilidad de resistencias.

Los medicamentos que se utilizan para el tratamiento del cáncer pueden ser indicados con fines curativos, paliativos, o como coadyuvantes de otras terapias.

Los pacientes con tratamiento oncológico pueden recibir medicación citostática en tres modalidades diferentes de internación: hospitalizado, en internación ambulatoria (Servicio Hospital de Día) y en internación domiciliaria. Esto dependerá del estado general del paciente, de las patologías concomitantes y del tipo de medicación a recibir, y tratándose de internación domiciliaria, de las condiciones culturales y socioeconómicas.

Las unidades de reconstitución de citostáticos de los servicios de Farmacia Hospitalaria y los centros prestadores de Servicios de Farmacia Hospitalaria, son las responsables de proveer las mezclas intravenosas de los medicamentos utilizados en el tratamiento de cáncer para los tres tipos de internación, prevenir la contaminación del medio ambiente durante la reconstitución y proteger al personal de salud durante la manipulación de principios activos citostáticos.

GLOSARIO

Agentes quimioterápicos antineoplásicos: son activos capaces de dañar células malignas afectando también a las células normales del organismo por lo que se los denomina agentes **citotóxicos** y dado que poseen la propiedad de inhibir el crecimiento de tumores malignos, por analogía se los llama **citostáticos.**

Carcinogénico: es toda aquella sustancia que pueda producir cáncer .

Citotóxico: es todo aquel agente que tenga capacidad de producir genotoxicidad, oncogenicidad y mutagenicidad.

Desinfección: este término suele usarse para designar los resultados de la aplicación de agentes químicos sobre objetos inanimados con el fin de eliminar los microorganismos incluyendo formas esporuladas.

Dispensación: es el acto farmacéutico asociado a la entrega y distribución de los medicamentos con las consecuentes prestaciones específicas, como son: el análisis de la orden médica, información para su correcta utilización y preparación de las dosis que se deben administrar.

En este acto, el farmacéutico informa y orienta al paciente, enfermera o médico, sobre el uso adecuado de dicho medicamento. Son elementos importantes de esta orientación, entre otros, el énfasis en el cumplimiento del régimen de dosificación, la influencia de los alimentos, la interacción con otros medicamentos, el reconocimiento de reacciones adversas potenciales y las condiciones de conservación del producto.

Distribución: es el sistema implementado para la entrega intrahospitalaria de los medicamentos requeridos por las unidades de internación u otros servicios del hospital para su posterior administración al paciente.

Dispositivos médicos (material descartable): instrumento, aparato, implemento, máquina, artefacto, implante u otro artículo similar o relacionado, incluidos los componentes, partes o accesorios de éstos.

Dosificación / posología: describe la dosis de un medicamento, los intervalos entre las administraciones y la duración del tratamiento. No debe confundirse con el término dosis.

Dosificación, régimen de: se define como la magnitud de las dosis administradas de un medicamento, el número de ellas y los intervalos de administración.

Dosis: cantidad total de medicamento que se administra de una sola vez o total de las cantidades fraccionarias administradas durante un período determinado.

Dosis, intervalo de: tiempo que transcurre entre una y otra administración de medicamentos en un régimen de dosificación de dosis múltiples.

Dosis Terapéutica: es la que produce el efecto deseado en el paciente; dosis mínima es la menor dosis que produce el efecto terapéutico y dosis máxima es la mayor dosis que puede ser tolerada sin aparición de efectos adversos o tóxicos. Los límites de dosis terapéuticas están dadas por la dosis máxima y dosis mínima e indican el margen de utilización de las drogas.

Dosis Tóxica: es la que produce efectos indeseables o peligrosos.

Establecimiento asistencial: son establecimientos con internación ya sean públicos o privados.

Esterilización: proceso por el cual se eliminan o se destruyen todas las formas viables de microorganismos, basado en una función de probabilidad.

Farmacia hospitalaria: es una especialidad farmacéutica que se ocupa de la selección, preparación, adquisición, control, dispensación, información de medicamentos y otras actividades orientadas a conseguir una utilización apropiada, segura y costo-efectiva de los medicamentos y productos sanitarios, en beneficio de los pacientes atendidos en los establecimientos asistenciales.

Farmacovigilancia: identificación y valoración de los efectos del uso, agudo y crónico, de los tratamientos farmacológicos en el conjunto de una población o en subgrupos de pacientes expuestos a tratamientos específicos. Se debe distinguir entre monitorización y farmacovigilancia.

Forma farmacéutica: es la forma del producto farmacéutico completo. (Por ejemplo. comprimido, cápsula, supositorio, etc.).

Filtro HEPA: filtro de alta eficiencia de partículas de aire compuesto por pliegues de filtros medios separados por lámina o papel corrugado o hoja de aluminio en el que el flujo directo del aire es forzado a través del filtro en un flujo paralelo uniforme. Los filtros HEPA retienen el 99,99 % de las partículas mayores a 0,3 micrones de diámetro.

Mutagénico: agente químico o físico que induce o incrementa mutaciones genéticas por cambios causados en el ADN.

Prescripción: es el acto de expresar qué medicamento debe recibir el paciente, la dosificación correcta y duración del tratamiento. En el caso de pacientes ambulatorios, el acto de prescripción se traduce en la elaboración de una receta médica; en los pacientes hospitalizados, la prescripción es consignada en la historia clínica.

Reconstitución: es la adición del disolvente sobre un producto en polvo o liofilizado, para lograr su disolución.

Relación riesgo/beneficio: esta relación se aplica al uso de un medicamento, está basada en los datos de eficacia y seguridad, además del uso potencial indebido, severidad y evolución de una enfermedad, etc. El concepto puede ser aplicado a un solo medicamento o en comparaciones entre dos o más medicamentos usados en la misma condición.

Vida útil: es el intervalo de tiempo durante el cual se espera que un medicamento almacenado correctamente satisfaga las especificaciones preestablecidas.

PREPARACIÓN DE CITOSTÁTICOS ENDOVENOSOS

PERSONAL

Selección del personal

El personal debe ser seleccionado y previamente entrenado en la técnica de preparación y manejo de citostáticos.

No podrán ingresar al área personal con procesos infecciosos ni personal dedicado a otras tareas de riesgo ocupacional, como por ejemplo, técnicos radiólogos.

Las mujeres que amamantan o embarazadas no deben trabajar con relación a la manipulación de estos fármacos.

Exámenes de salud para el personal

Uno de los aspectos relacionados con este tema, es el riesgo a que está expuesto el personal sanitario que debe manipular citostáticos. Éste ha sido un motivo de preocupación creciente en los últimos años que tiene su origen en la abundante evidencia científica internacional que indica que la exposición crónica y masiva con estos activos, puede causar efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos. Estos efectos nombrados precedentemente sólo se producen en casos de exposiciones muy altas y no existe evidencia de que ocurran en el caso de niveles bajos exposición. Sin embargo, debe constituir un llamado de atención sobre los posibles peligros que enfrentan los profesionales relacionados a la manipulación de citostáticos.

Existen pocas dudas de que los trabajadores expuestos a agentes citotóxicos al preparar y adminis-

trar las dosis terapéuticas para ser utilizados en la quimioterapia de pacientes con cáncer, pueden absorber cantidades mensurables de los mismos. La absorción se puede realizar por piel, mucosas o pulmones. Adicionalmente, es objeto de controversia los daños que puede causar la absorción involuntaria de pequeñas cantidades de estos agentes.

Distintas variables determinan la posibilidad de intoxicación de los individuos con respecto a estos activos:

- *Características de los Principios Activos*

El riesgo potencial depende de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos. No todos los citostáticos son igualmente agresivos. Según diferentes estudios realizados tienen mayor potencial carcinogénico y teratogénico los agentes alquilantes y los derivados de la vinca, considerándose los menos agresivos los antimetabolitos.

- *Susceptibilidad del individuo*

Las distintas generalidades relacionadas con estas variables son la edad, el sexo, el origen étnico, etc.

- *Cofactores*

Tales como hábitos alimentarios o hábitos de vida, como el fumar, pueden alterar la susceptibilidad del individuo a los efectos de estos fármacos.

- *Número de exposiciones*

Tiene que ver con la magnitud de la exposición o la suma acumulada de las mismas.

- *Vías de exposición y efectos*

Vías de exposición

Ingestión

Se puede producir por el consumo de alimentos o bebidas, o el uso de cigarrillos o cosméticos contaminados.

Inhalatoria

Por las partículas aerosolizadas que se forman durante el proceso de reconstitución y preparación de las dosis terapéuticas, ya sea al retirar la aguja del vial, al romper una ampolla, etc.

Absorción dérmica

Por contacto con derrames por ruptura de ampollas o contaminación de los equipos durante la manipulación, administración, limpieza rutinaria o eliminación de los desechos.

Efectos

Locales

Son los que se producen como consecuencia de derrames o accidentes que ponen al citostático en contacto con la piel o las mucosas. Según las características del activo pueden causar irritación local en caso de citotóxicos irritantes y ulceración con posterior necrosis de la zona en el caso de activos vesicantes, como por ejemplo, antraciclinas.

Sistémicos

Son los que se producen tras un largo período de tiempo por repetidas exposiciones a bajas dosis. En este caso es más difícil demostrar la relación causa-efecto por las dificultades que plantea su estudio.

El servicio de Higiene y Medicina Laboral deberá ser informado de todos los accidentes debidos a manipulación de agentes citotóxicos.

El riesgo demostrado de estos agentes de producir los efectos previamente mencionados, unido al hecho de que estas sustancias pueden ser absorbidas como consecuencia de exposiciones profesionales, justifica la adopción de controles periódicos de salud sugiriéndose su realización por lo menos una vez al año.

Deben existir registros de los resultados de los exámenes de salud a los que es sometido el personal en el ámbito del sector.

INSTALACIONES

Es recomendable que el servicio de reconstitución y formulación de citostáticos esté compuesto por los siguientes sectores:

- Vestuario general para el acceso exclusivo del personal del servicio o personas autorizadas.
- Pasillo interno que se comunique con la oficina técnica, depósitos, sector de preparación de materiales y el vestuario específico.
- Depósito de medicamentos.
- Depósito de materiales.
- Sector de preparación de materiales.
- Vestuario específico que comunique el pasillo interno con el área de preparación de soluciones.
- Sector de preparación de soluciones, donde se efectuará la reconstitución y / o formulación de citostáticos.
- Sector de almacenamiento de soluciones terminadas.

Características edilicias de cada sector:

Vestuario general

Deberá ser de acceso restricto, y se instaurará un sistema de registro de control de ingreso.

En el mismo, el personal se quitará la ropa de calle y se colocará ropa diferenciada del resto de los

sectores para tener acceso a los sectores de depósito de materiales, depósito de medicamentos, sector de preparación de materiales y sector de almacenamiento de soluciones terminadas.

Pasillo interno

Su función es comunicar los diferentes sectores de acceso común y servir de ingreso a través de un vestuario específico al área restringida (área de preparación de soluciones).

Depósito de materiales

Deberá ser de acceso restricto.

Poseerá estanterías metálicas o armarios donde almacenar los materiales que se utilizarán en las tareas de reconstitución durante un período no mayor a una semana.

Depósito de medicamentos

Deberá cumplir con lo especificado para el depósito de materiales. En caso de utilizarse medicamentos que requieran refrigeración deberá contar con una heladera de capacidad adecuada al volumen de los medicamentos a almacenar.

Deberá controlarse y registrarse periódicamente la temperatura a fin de verificar que la misma condiga con la necesaria para los productos allí almacenados.

Sector de preparación de materiales

Se utilizará para la desinfección externa de los medicamentos y envases a introducir al sector de preparación.

Deberá contar con una pileta con provisión de agua fría y caliente, y con sifón sanitario.

Se comunicará con el pasillo interno o con el depósito y con el sector de preparación de soluciones mediante pasa bandejas con doble puerta y sistema de enclavamiento que impida la apertura simultánea de las mismas.

Todas las superficies de trabajo serán lisas y libres de discontinuidades. Deberán ser de materiales resistentes a los productos de trabajo y a los desinfectantes de rutina e inactivantes de uso en caso de derrames.

El piso y paredes estarán construidos con materiales que presenten superficies lisas y libres de discontinuidades, y recubiertos por materiales que resistan el tránsito y los agentes desinfectantes.

Los encuentros cóncavos entre piso, paredes y cielorraso deberán ser redondeados con un radio de curvatura no inferior a los 5 cm para facilitar su limpieza.

El sistema de ventilación asegurará una temperatura de 20 ± 2°C.

Sector de almacenamiento de soluciones terminadas

En este sector se reciben, almacenan y distribuyen las soluciones terminadas.

Debe poseer una superficie de apoyo de dimensiones adecuadas para disponer en forma ordenada dichas soluciones, ya rotuladas dentro del sector de preparación de soluciones, de modo de evitar confusiones.

Deberá estar equipado con una heladera de ser necesario, una selladora térmica de plásticos para el cierre hermético del envase protector de la mezcla preparada o bolsas plásticas con sistemas de auto sellado.

Sector de preparación de soluciones

Vestuario específico: es recomendable que conste de dos etapas, en la primera de las cuales el personal que ingrese al sector de preparación de materiales se quitará la ropa de circulación, en la segunda etapa se colocará la ropa estéril incluyendo, cofia o escafandra, cubrebotas y se lavará las manos con solución jabonosa desinfectante, colocándose un primer par de guantes quirúrgicos sin talco ubicados por encima del puño y protección respiratoria si fuese necesario. Luego pasará al área de preparación donde se colocará el segundo par de guantes.

El personal, al salir del área de preparación, deberá disponer la vestimenta utilizada de forma de ser inactivada previo a la salida del sector de preparación para ser luego lavada, secada y esterilizada por procedimientos específicos.

Es recomendable que este vestuario cuente con un sistema de duchas para ser utilizadas por el personal después de retirarse la ropa específica del área de preparación y antes de colocarse la de circulación general.

Los materiales constructivos y los detalles de terminación deben ser similares a los ya descriptos para los sectores de preparación de materiales.

Area de preparación: es el local donde se efectuará la reconstitución y/o formulación de los citostáticos.

El mismo deberá poseer la amplitud necesaria para asegurar el movimiento del personal y los materiales, y facilitar las tareas de limpieza y descontaminación de todas las superficies.

Las características referentes a superficies de trabajo, piso, paredes y encuentros cóncavos entre piso, paredes y cielorraso deberán ser las mismas que las descriptas para *Sector de preparación de materiales.*

El sistema de ventilación asegurará una temperatura ambiente de 20 ± 2°C, y el local cumplirá

con un nivel de limpieza clase D o mejor (clase 10.000).

La inyección se realizará mediante filtros HEPA terminales, que serán verificados en forma periódica por personal especializado.

El aire podrá recircularse sólo si no se generan gases o vapores tóxicos, inflamables o explosivos dentro del sector. No se recirculará el aire a otros sectores.

Si el aire o parte de él debe expulsarse al exterior, se hará mediante filtros HEPA colocados en las bocas de extracción del local (en forma previa al motoventilador de extracción) y con un sistema de cambio que evite la exposición del operador a los productos allí retenidos.

Este local poseerá una presión diferencial negativa de 15 a 25 Pa respecto del vestuario.

El sistema de iluminación deberá ser de tipo estanco y quedar a ras del cielorraso.

Todas las acometidas de servicios deberán ser selladas en su punto de ingreso al sector, a fin de evitar la entrada de contaminantes.

Los residuos peligrosos se deben descartar en envases plásticos de cierre hermético y luego en bolsas rojas de 50 a 100 μm para su posterior incineración.

Las operaciones que involucren citostáticos deberán ser realizadas dentro de gabinetes de seguridad biológica clase II del tipo adecuado, siendo de extracción total (tipo B2) si durante las operaciones se generan gases o vapores peligrosos.

En caso contrario, será suficiente con un gabinete clase II tipo A/B3.

Los mismos deberán ser construidos de acuerdo a la normativa vigente, y deberán ser reverificados por personal especializado en forma periódica.

Controles ambientales

- Controles de partículas

Se deberá efectuar un control de la cantidad de partículas inertes y tamaño de las mismas por medio de instrumental electrónico. Dicho control debe efectuarse, al menos, una vez al año y toda vez que dentro del área se produzcan modificaciones significativas.

- Controles microbiológicos

Los controles ambientales se realizarán por captación espontánea mediante placas de Petri o captación forzada para determinar la biocarga del área. Los controles de superficies planas se harán mediante placas de impresión y los de superficies irregulares (manijas de puertas y aberturas) mediante hisopado de las mismas.

Estos controles deberán ser efectuados como mínimo cada seis meses o inmediatamente después de realizar modificaciones en el área, reparaciones o servicios técnicos de mantenimiento en cabinas de flujo laminar o cualquier otro cambio significativo.

Se establecerán niveles de alerta y acción, con exhaustiva revisión para determinar causales, y medidas correctivas, aplicadas de manera rigurosa para volver a los niveles preestablecidos.

Controles al personal

- Determinación de las destrezas del personal

Método: para este fin se prepararán equipos de entrenamiento que deberán contar con ampollas conteniendo una solución fluorescente incolora a la luz visible. Se procederá a realizar una simulación de trasvasamiento de contenidos y operaciones de llenado aséptico observando, luego de finalizada la tarea, la superficie de la cabina o lugar de simulación con luz ultravioleta. En caso de no cumplirse el estándar de calidad interno se procederá a un nuevo entrenamiento del personal. Se deberá establecer un monitoreo cada seis meses registrándose los datos obtenidos.

EQUIPAMIENTO

El equipamiento necesario para la Reconstitución de medicamentos citostáticos incluye **equipos de aire unidireccional vertical o Cabinas de seguridad biológica de Clase II .**

Los gabinetes de seguridad biológica Clase II son equipos que se distinguen por poseer una abertura anterior, por la que el operador introduce sus manos y antebrazos para manipular objetos en su interior.

En estos equipos se combinan dos necesidades o características: se protege al producto del operador y del ambiente, y se protege al operador y al ambiente del producto.

Si bien todos los gabinetes de seguridad biológica Clase II poseen un flujo laminar vertical, hay que considerar que existen equipos de flujo laminar vertical para protección del producto que no protegen ni al operador ni al ambiente.

Los gabinetes de seguridad biológica Clase II tipo B3 poseen un filtro HEPA de inyección ubicado en la cara superior de la zona de trabajo, que envía aire en flujo unidireccional sobre la superficie de trabajo. La velocidad de aire de esta cortina no debe ser, en ningún punto, inferior a los 0,50 m/s. El aire aspirado se distribuye un 70 % hacia el filtro HEPA de inyección recirculando internamente, mientras que el 30 %, que es el mismo caudal aspirado desde el exterior, es expulsado al exterior del ambiente a través de un segundo filtro HEPA de extracción.

SANEAMIENTO

La limpieza del área y equipos debe ser realizada por personal calificado perteneciente a la unidad, con una frecuencia diaria, previo al inicio de las actividades y al finalizar la jornada de trabajo o cuando se requiera de acuerdo a las manipulaciones realizadas.

Dada la índole de trabajo realizado en la zona de cabinas de flujo laminar de la Unidad de Reconstitución de Citostáticos y el riesgo que puede implicar para los pacientes la acumulación de partículas, la limpieza de dicha zona se hará de acuerdo a Normas que se establezcan en el sector para dar cumplimiento a los indicadores de calidad preestablecidos verificando que la misma sea efectiva. Se deberá contar con los registros correspondientes.

PROCEDIMIENTOS DE MANIPULACIÓN

Se entiende como manejo de citostáticos al conjunto de operaciones que incluyen desde la recepción del medicamento hasta la eliminación de los residuos. La manipulación debe realizarse de modo de asegurar la protección al paciente, al ambiente y al personal de salud encargado de la preparación de estos fármacos.

Comprende las siguientes operaciones

- Recepción y almacenamiento de medicamentos
- Control farmacéutico de la indicación médica
- Generación de la orden de preparación, reconstitución de citostáticos y preparación de la dosis terapéutica
- Dispensación y distribución
- Recomendaciones para la administración.

La recepción de **medicamentos citostáticos** se realizará siguiendo el mismo procedimiento que para otras especialidades medicinales (en lo referente al aspecto, integridad del envase, caducidad, etc.)

Para su almacenamiento se deberá reservar un sector especial separado para este tipo de fármacos y contar con un refrigerador , de ser necesario. Los envases deberán disponerse de forma tal que se prevenga su ruptura por causas accidentales. Se tendrán en cuenta las características de cada medicamento: termolábiles, fotosensibles, etc.

El **material** deberá ser almacenado en el depósito correspondiente, limpio y cuando corresponda, estéril.

Cuando el material sea recibido en cajas, las mismas deberán ser eliminadas y reemplazadas por otro contenedor de material apropiado (que no libere partículas).

Se deberá llevar un informe escrito de las prescripciones médicas que se reciban y deberán ser interpretadas por el profesional farmacéutico del servicio.

El farmacéutico debe validar la prescripción, cuando se observe alguna diferencia en la dosis, inestabilidad por el tipo de solvente indicado o falta de algún dato del paciente se comunicará con el médico tratante.

Se confeccionará una **Planilla de Registro** por paciente donde conste número de historia clínica, nombre del médico, datos de filiación del paciente, diagnóstico, ubicación dentro de la institución o el domicilio (si se trata de un paciente ambulatorio), nombre genérico del medicamento a preparar, dosis, vehículo, volumen total, vía de administración, protocolo de indicación médica y día del ciclo.

A partir de la prescripción médica se confeccionará una **Orden de Preparación** que deberá incluir, además de los datos mencionados anteriormente, las dosis del medicamento en las unidades correspondientes (g, mg, UI, etc.), el solvente para la reconstitución (si se trata de un frasco ampolla con liofilizado o polvo), el volumen a utilizar de esa reconstitución y el volumen total en ml y tipo de solvente para hacer la dilución. También se deben registrar, tanto en la Orden de Preparación, para información del farmacéutico, como en el rótulo, para comunicación a enfermería, las alertas de incompatibilidades, estabilidad, condiciones de conservación, ritmo de infusión, fecha y horario de caducidad, y otras observaciones.

Se recomienda redactar un manual de procedimientos donde se contemplen todas las operaciones que se realizan en el servicio.

Los viales deben ser venteados con una aguja para eliminar presiones que pudieran provocar proyecciones del activo o aerosoles hacia el operador. Para evitar sobrepresiones en la etapa de reconstitución de los viales con el objeto de reducir el riesgo de formación de aerosoles, se recomienda utilizar agujas con filtro de venteo o la técnica de presión negativa introduciendo dentro del vial un volumen de aire idéntico al volumen del liquido a extraer. Colocar una gasa estéril alrededor de la aguja y sobre el tapón del vial cuando se retira la solución de citostático del mismo. Las proyecciones de medicamentos citostáticos hacia las paredes o el filtro de la cabina de flujo laminar puede provocar su deterioro y riesgo de toxicidad. El volumen final en la jeringa se mide antes de retirar la aguja del vial, con el fin de no descartar medicación al medio ambiente. Las jeringas y los recipientes que contie-

nen las soluciones deben ser rotuladas de inmediato. Las jeringas y agujas usadas deben ser descartadas en un dispositivo dispuesto para ese fin no reutilizable. Todos los elementos utilizados deben ser desechados en bolsas rojas reservadas para tal fin. Se debe registrar inmediatamente las preparaciones efectuadas, indicando cantidad preparada, datos del paciente y técnico responsable en un libro habilitado a tal fin.

ESTABILIDAD

Se recomienda consultar bibliografía específica y confeccionar protocolos de estabilidad y compatibilidad de los medicamentos citostáticos.

CONTROL DE CALIDAD

Se deberá establecer un programa de control periódico referente a la identificación del principio activo y las dosis.

La reconstitución de fármacos citostáticos puede ocasionar errores de medicación que impliquen graves consecuencias para los pacientes debido a su estrecho margen terapéutico. En el proceso global de tratamiento con quimioterapia existen distintos pasos en los cuales se puede producir un error potencial. Por este motivo, es necesario establecer estrategias para reducir la probabilidad de que esto último ocurra. La preparación es uno de los puntos más críticos de todo el proceso, y por tanto resulta imprescindible la implementación de controles de calidad para reducir la probabilidad de que se produzca un error. Se han establecido diferentes sistemas para controlar la calidad de los preparados: control de volúmenes, control de viales utilizados, control de pesada y controles de rótulo. No obstante, no existe hasta el momento ningún método infalible para detectar errores de dosificación.

- **Inspección visual**

Se deberá inspeccionar cambio de coloración, presencia de partículas visibles, turbidez, formación de gas, integridad del envase y del cierre.

- **Control de rótulo**

En el proceso de preparación, además de establecer medidas para disminuir errores de dosificación con el rotulado de los viales previo a su preparación, también es importante establecer un control de etiquetado previo a la dispensación por comparación del rótulo con la prescripción y la orden de preparación.

DISTRIBUCIÓN Y DISPENSACIÓN

El profesional farmacéutico es responsable de la distribución y dispensación de los medicamentos citostáticos preparados:

- Se deberán entregar corroborando nombre del paciente y número de cama o habitación y servicio, dispuestos dentro de un envase herméticamente cerrado y rotulado.
- Se confeccionará un listado global diario de los pacientes que reciben tratamiento y de los medicamentos citostáticos preparados. Estos listados servirán como control de dispensación y serán firmados por la enfermera o auxiliar que los reciba.
- Se recomienda que el producto terminado sea entregado con el dispositivo médico adecuado.

ADMINISTRACIÓN

La administración estará a cargo del personal de enfermería calificado.

El farmacéutico especializado en oncología, trabajará en forma conjunta con el equipo de salud para lograr la administración óptima del medicamento al paciente.

Se enumerarán a continuación algunas recomendaciones generales para la administración por parte del personal de enfermería y sobre el manejo de las excretas.

Recomendaciones para la administración de citostáticos

- Utilizar guantes estériles y descartarlos después de cada uso.
- Utilizar barbijo para protección de pacientes inmunocomprometidos.
- Usar camisolín de mangas largas con puños elastizados, tener en cuenta que los guantes deben ir por debajo del puño del camisolín.
- Controlar la administración, para detectar posibles extravasaciones.
- La orina y heces de estos pacientes deben manipularse con sumo cuidado y usando guantes.

BIOSEGURIDAD

Exposición accidental

Después de una exposición sin contacto con la piel, se deben quitar los guantes y prendas contaminadas, lavar las manos y colocar guantes nuevos. Si el citostático tomara contacto directo con la piel del manipulador se recomienda seguir las indicaciones descriptas en la *Tabla* . Si el área afectada está lacerada o irritada es conveniente consultar inme-

diatamente al médico. En el caso de producirse un corte con aguja o con vidrio hay que lavar la zona con abundante agua tibia y jabón, y consultar inmediatamente al médico.

Derrames

Pueden producirse derrames por accidente, durante la preparación, administración o transporte de los medicamentos citotóxicos. Todo el personal implicado en la limpieza de un derrame debe llevar material protector (barbijo de baja porosidad, doble guante y camisolín). El material conteniendo el agente citotóxico, se considerará contaminado y por tanto, se colocará en una bolsa, de polietileno color rojo de no menos de 100 µm de espesor, para su destrucción.

El equipo para derrames estará convenientemente acondicionado e identificado en un lugar fácilmente accesible.

- Protocolo de actuación en caso de derrames
- Barbijo de baja porosidad
- Anteojos protectores
- Doble par de guantes, de polivinilo o neopreno
- Botas o cubre calzados
- Pala para recolectar restos de material y vidrios
- Doble bolsa descartable para restos de citostáticos
- Paños y gasas absorbentes
- Escobilla recolectora
- Kit de neutralizantes químicos
- Sachet de agua

Desechos

Los desechos deben colocarse en recipientes de paredes rígidas para su posterior incineración.

Nunca deberán arrojarse medicamentos ni desechos citostáticos a la red cloacal o desagües.

Composición:

Tabla - Recomendaciones a seguir en caso de exposición accidental con contacto directo con la piel.

[NOTA: en todos los casos de contacto con citostáticos se recomienda consultar rápidamente al servicio de Medicina Laboral.]

Farmaco	*Acción en la piel*	*Norma de actuación en caso de contacto con la Piel*
Actinomicina - D	Vesicante	Sumergir 10´ en buffer fosfato , luego lavar con agua y jabón
Amsacrina	Vesicante	Lavar con agua y jabón
Bleomicina	Tóxico local , Alegógeno	Lavar enérgicamente con agua y jabón
Carboplatino	No Irritante	Lavar con agua
Carmustina	Vesicante	Lavar con agua . Si aparece irritación aplicar solución de CO_3HNa
Ciclofosfamida	Irritante	Lavar con agua
Cisplatino	Potencial alergénico	Lavar con abundante agua
Citarabina	Irritante	Lavar con abundante agua y jabón
Dacarbazina	Irritante	Lavar con agua y jabón
Daunorubicina	Irritante - Vesicante	Lavar rápidamente con agua y jabón
Doxorubicina	Irritante - Vesicante	Lavado abundante con agua y jabón
Epirubicina	Irritante - Vesicante	Lavado abundante con agua y jabón
Etopósido	Irritante	Lavar con abundante agua
Fluorouracilo	Inflamación en la piel	Lavar con agua
Idarubicina	Irritante - Vesicante	Lavado abundante con agua y jabón
Ifosfamida	Irritante	Lavar con agua
Irinotecan	No Irritante	Lavar con agua
L - Asparaginasa	No Irritante	Lavar con agua
Mecloretamina	Vesicante	Lavar rápidamente con agua y jabón

Melfalán	Vesicante	Lavar rápidamente con agua y jabón
Metotrexato	No Vesicante	Lavado con abundante agua
Mitomicina	Vesicante	Lavar con CO_3HNa 1M , luego con abundante agua y jabón
Mitoxantrona	Irritante	Lavar con agua
Oxaliplatino	No Irritante	Lavar con agua
Paclitaxel	Irritante	Lavar con abundante agua
Tenipósido	Irritante	Lavar con abundante agua
Thiotepa	No Irritante	Lavar con agua
Vinblastina	Irritante - Vesicante	Lavar con abundante agua
Vincristina	Irritante - Vesicante	Lavar con abundante agua
Vindesina	Irritante - Vesicante	Lavar con abundante agua

1027. BUENAS PRÁCTICAS DE PREPARACIÓN DE MEDICAMENTOS MAGISTRALES

ALCANCE Y DEFINICIONES

Buenas Prácticas de Preparación de medicamentos magistrales: es el conjunto de normas y procedimientos que contribuyen a asegurar la calidad de los medicamentos magistrales.

Medicamento magistral: es todo medicamento prescripto en una receta magistral para un paciente individualizado, posteriormente preparado, envasado y rotulado por un Farmacéutico en el laboratorio de su Farmacia y dispensado en la misma.

Receta magistral: la receta magistral debe indicar claramente la composición cuali-cuantitativa de los principios activos, utilizando los nombres establecidos en la Farmacopea Argentina o la Denominación Común Internacional (DCI) de la OMS. Sólo se aceptan sinonimias contempladas en la Farmacopea Argentina. Debe respetar las dosis habituales y máximas, indicadas en la Farmacopea o, en su ausencia en bibliografía internacional de referencia.

Debe indicar la vía e indicaciones de administración, los datos completos del profesional prescriptor, los datos del paciente y la fecha de emisión.

CAPÍTULO 1º

PERSONAL

La preparación de medicamentos magistrales puede ser efectuada por el Farmacéutico Director Técnico o por los Farmacéuticos Auxiliares. La Farmacia debe estar debidamente habilitada a tal efecto por la Autoridad Sanitaria jurisdiccional competente.

El Director Técnico es el responsable de la calidad y seguridad de los preparados magistrales, siendo por ello responsable del origen, la calidad y la pureza de los principios activos, excipientes, envases y otros materiales que utilice, del diseño galénico, de la preparación de los productos y del aseguramiento de su calidad.

El Director Técnico debe organizar las tareas relacionadas con la preparación de medicamentos magistrales, debiendo precisar por escrito las funciones de los Farmacéuticos Auxiliares y del resto del personal, y supervisar su cumplimiento.

El Director Técnico debe asegurar la aptitud de todo el personal involucrado en la preparación de medicamentos magistrales y el cumplimiento por parte de éste de las Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales.

CAPÍTULO 2º

LOS PREPARADOS MAGISTRALES

Para la preparación de cada medicamento magistral es necesario contar con la receta correspondiente, la cual deberá estar completa en todas sus partes y contener toda la información necesaria para llevar a cabo la preparación y rotular adecuadamente la misma, correspondiendo al Director Técnico completar la fórmula con los excipientes adecuados, debiendo respetar las dosis habituales y máximas recomendadas para los principios activos.

La preparación del medicamento magistral debe registrarse en el libro recetario.

Por la propia naturaleza de estos medicamentos y el conocimiento específico que dispone el Farmacéutico que lo prepara, es de su competencia proveer al paciente la información necesaria para su correcta utilización y conservación.

CAPÍTULO 3º

LABORATORIOS

3-1 Consideraciones generales

La preparación y el control de los preparados magistrales deben efectuarse en laboratorios que forman parte de la estructura edilicia de la Farmacia y estar emplazados en salas totalmente independientes del lugar de atención al público, separados del depósito y aislados de otras dependencias de la Farmacia.

Todas las áreas de la Farmacia destinadas a las preparaciones magistrales deben contar con espacios adecuados para la disposición ordenada de los equipos y materiales, y deben poseer condiciones de temperatura y humedad apropiadas.

3-2 Instalaciones

Para la preparación de medicamentos magistrales la Farmacia debe disponer de un laboratorio general, destinado a la preparación de formas farmacéuticas no estériles, al fraccionamiento de materias primas y excipientes y al aseguramiento de la calidad, pudiendo contar con otros laboratorios especiales.

3-3 Características

El laboratorio debe contar con buena iluminación, adecuada renovación de aire y mallas metálicas en todas las aberturas de ventilación e instrumentos para medir la temperatura y humedad del ambiente de trabajo. Sus pisos, paredes y

techos deben ser lisos con bordes sanitarios y las mesas de trabajo deben ser lisas, impermeables y resistentes a agentes químicos.

Los laboratorios especiales deben cumplir con requisitos adicionales que los hagan aptos para la actividad a desarrollar.

3-4 Materiales y Equipos

Deben ser acordes con el tipo de medicamentos a preparar, suficientes en cantidad y calidad y apropiadamente acondicionados e instalados. En los equipos que requieren calibración, ésta debe realizarse con la periodicidad adecuada y su calibración debe verificarse y documentarse regularmente.

3-5 Higiene y Seguridad

La Farmacia debe contar con directrices escritas sobre higiene y seguridad, las cuales deben ser acordes con el tipo de medicamento a preparar y exhibirse en lugar visible del laboratorio. El Director Técnico es responsable de generar, documentar, hacer cumplir y llevar un registro del cumplimiento de dichas directrices.

3-6 Limpieza

La Farmacia debe contar con procedimientos de limpieza del área de preparación de medicamentos magistrales acordes con el tipo de preparaciones que se realicen. El Director Técnico es el responsable de generar y documentar dichos procedimientos y de asegurar y documentar debidamente su cumplimiento.

3-7 Residuos

La Farmacia deberá contar con mecanismos para el manejo interno y la disposición de residuos considerados peligrosos. El Director Técnico es responsable de generar e implementar los procedimientos apropiados y necesarios para tal fin y de asegurar y documentar debidamente su cumplimiento.

CAPÍTULO 4º

DOCUMENTACIÓN

4-1 General

La documentación constituye una parte fundamental del sistema de aseguramiento de la calidad. Son aceptables los registros computarizados y los producidos mediante microfilmación.

Toda la documentación referida a materias primas y excipientes debe utilizar los nombres oficiales de la FA o la Denominación Común Internacional (DCI) para sustancias no codificadas.

4-2 Manuales, procedimientos y registros

La Farmacia debe contar con un manual operativo general y manuales de uso, mantenimiento y calificación de sus equipos.

La Farmacia debe poseer procedimientos operativos estandarizados para el uso de cada uno de sus equipos, para la preparación de medicamentos magistrales de uso corriente y para las actividades de limpieza, disposición de residuos, higiene y seguridad.

La Farmacia debe contar con registros individuales de entrenamiento y calificación del personal.

En la Farmacia se deben almacenar los registros de mantenimiento y calificación de equipos, y los registros que permitan verificar el cumplimiento de las actividades de limpieza, disposición de residuos, higiene y seguridad.

En la Farmacia se debe llevar todo libro oficial que asegure y avale el debido cumplimiento de las regulaciones vigentes.

4-3 Materias primas, envases y materiales de acondicionamiento

Todos los materiales que ingresan a la Farmacia para ser empleados en la preparación, envasado y acondicionamiento de medicamentos deben contar con una ficha individual de registro que incluya la fecha de ingreso.

Toda materia prima y excipiente que ingresa a la Farmacia debe contar con su correspondiente certificado de análisis del proveedor firmado por su Director Técnico; caso contrario, el Director Técnico de la Farmacia deberá realizar los controles pertinentes.

La documentación correspondiente a todos los materiales utilizados en la preparación de los medicamentos magistrales debe ser debidamente archivada.

CAPÍTULO 5º

MATERIAS PRIMAS, ENVASES Y MATERIAL DE ACONDICIONAMIENTO

La calidad de las materias primas, envases y materiales de acondicionamiento inciden en la calidad del producto final, por lo que el Farmacéutico debe tener especial cuidado en todos los aspectos del manejo de los mismos.

5-1 Materias primas

Sólo pueden ser empleadas aquellas materias primas, principios activos y excipientes, codificadas en la Farmacopea Argentina o descriptas en textos de reconocida jerarquía.

Todas las materias primas que ingresan a la Farmacia deben ser puestas en cuarentena, debidamente rotuladas y en una ubicación especial, hasta tanto se haya verificado su identidad con la documentación que respalda su calidad. El Director Técnico es responsable de la realización de todo esfuerzo razonable en procura de la identificación

de toda materia prima que ingresa a la Farmacia. El período de cuarentena finaliza con la aceptación o rechazo de la materia prima.

Las materias primas rechazadas deben ser almacenadas separadamente, hasta su disposición como residuo o devolución al proveedor.

Toda materia prima que haya superado la fecha de reválida o reanálisis, (ver *1040. Estudios de Estabilidad*) debe ser puesta en cuarentena hasta tanto se determine analíticamente su aptitud y una nueva fecha de reanálisis; en caso de no ser apta debe almacenarse separadamente para su disposición como residuo.

La utilización, en casos debidamente justificados, de una especialidad medicinal como materia prima, para la preparación de un medicamento magistral, quedará a criterio del Director Técnico.

5-2 Rotulado

Todo envase de materia prima o excipiente debe contener todos los datos que permitan su correcta identificación, debiendo consignarse de manera obligatoria su nombre, proveedor, número de lote o partida, fecha de reanálisis y número de registro.

5-3 Almacenamiento

Las materias primas deben ser almacenadas bajo condiciones apropiadas, que aseguren su estabilidad durante su período de vida útil. (ver *Consideraciones Generales)*

5-4 Envases

El medicamento magistral debe ser envasado en envase apto (ver *Consideraciones Generales, 420. Envases primarios de plástico* y *430. Envases de vidrio*), de acuerdo a las propiedades físicas y químicas del preparado farmacéutico, de modo de evitar se alteren la calidad, la concentración o la pureza de la preparación. Se debe considerar la posible interacción de los productos activos con el envase.

CAPÍTULO 6º

PREPARACIÓN

6-1 Diseño de la fórmula

La correcta preparación de una fórmula magistral comienza con el diseño de la misma, tras la recepción de la receta magistral.

La fórmula debe evaluarse para determinar la factibilidad de su preparación y debe emplearse un diseño galénico que tenga en cuenta el comportamiento fisicoquímico de sus componentes, sus posibles incompatibilidades y las eventuales interacciones con el envase.

Para el ajuste de la fórmula cuantitativa se debe tener en cuenta la expresión correcta de la dosis establecida en la presente Farmacopea o en la bibliografía internacional de referencia.

6-2 Preparación del medicamento magistral

Debe hacerse en una zona de trabajo limpia y libre de cualquier producto, material o documento ajeno a la preparación, debiendo estar asegurada previamente la provisión de todos los elementos y documentación necesarios como así la limpieza y el adecuado funcionamiento de los equipos a utilizar.

6-3 Vencimiento del medicamento magistral

Los preparados magistrales se realizan para una administración a plazo definido y corto, por lo que deben poseer fechas de vencimiento asignadas acordes al período de tratamiento.

6-4 Rotulado

Los medicamentos magistrales deben estar debidamente rotulados (ver *Consideraciones Generales)* para asegurar su correcta identificación, haciendo constar en el rótulo la composición cuali-cuantitativa de sus principios activos, la composición cualitativa de sus excipientes, su forma farmacéutica y su vía de administración, posología y condiciones de conservación, fecha de preparación y vencimiento, y su número de registro en el libro recetario, como así datos del paciente, del médico que lo prescribió, la Farmacia donde se preparó y su Director Técnico.

CAPÍTULO 7º

ASEGURAMIENTO DE CALIDAD

Se debe poner especial énfasis en asegurar la calidad de todos los pasos de la preparación, documentando apropiadamente cada uno.

Para las diferentes formas farmacéuticas, se exigen los siguientes ensayos:

7-1 Cápsulas y comprimidos

Aspecto
Control de peso
Prueba de desintegración

7-2 Polvos

Aspecto
Control de peso
Reconstitución: en el caso que sea aplicable.

7-3 Inyectables en ampollas y viales

Aspecto y examen de partículas por observación visual.

pH del inyectable.

Control de cierre de las ampollas.

Control de contenido.

Control de esterilidad, para inyectables obtenidos por llenado aséptico.

Validación de procesos de esterilización para inyectables obtenidos por esterilización final.

Control de endotoxinas bacterianas. Se debe realizar para aquellos preparados que por la naturaleza de sus componentes, por el volumen de administración, o por las particularidades del tratamiento, así lo justifiquen.

7-4 Cremas, geles, ungüentos y pastas

Aspecto

pH

Control de contenido.

7-5 Supositorios y óvulos

Aspecto y homogeneidad por examen visual

Control de peso

Tiempo de fusión o Prueba de Disgregación

7-6 Soluciones, suspensiones y emulsiones (orales y tópicas)

Aspecto

pH

Hermeticidad del cierre

Control de contenido

7-7 Observaciones

Los preparados no inyectables estériles deben cumplir con el ensayo de esterilidad o la validación del proceso de esterilización según corresponda. Los colirios deben cumplir las condiciones de inyectables con excepción de endotoxinas bacterianas.

CAPÍTULO 8º

FUENTES DE INFORMACIÓN

La Farmacia debe disponer de la última edición de la FA, recomendándose además otros códigos y textos actualizados de reconocida jerarquía, que provean una razonable cobertura de información específica.

Deberá contemplar disponer de los medios apropiados para acceder a bases de datos y centros de información sobre medicamentos que provean información farmacéutica y farmacoterapéutica actualizada y pertinente que contribuyan a garantizar la calidad y seguridad de los medicamentos.

CAPÍTULO 9°

Las Farmacias que preparan medicamentos magistrales, además de cumplir las Buenas Prácticas de Preparación de medicamentos magistrales establecidas en esta farmacopea, deberán cumplimentar los requerimientos legales establecidos por la Autoridad Sanitaria jurisdiccional competente para este tipo de actividades.

1030. CRIADEROS DE POLLOS LIBRES DE PATÓGENOS ESPECIFICADOS PARA LA PRODUCCIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS VACUNAS

Ver *1030. Criaderos de pollos libres de patógenos especificados para la producción y control de calidad de las vacunas* en *Apartado de Vacunas* en *Volumen III.*

1035. EQUIVALENCIA ENTRE MEDICAMENTOS

La seguridad, eficacia y calidad de los productos multifuente se sustenta fundamentalmente sobre dos pilares: los estudios de equivalencia in vivo y/o in vitro y las Buenas Prácticas de Manufactura.

Los estudios de equivalencia permiten caracterizar el comportamiento de una preparación farmacéutica multifuente con respecto a una preparación de referencia de manera de obtener una predicción confiable de sus efectos y garantizar la equivalencia terapéutica.

Los estudios de equivalencia in vivo involucran estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos o ensayos clínicos comparativos, mientras que los estudios de equivalencia in vitro se llevan a cabo mediante la comparación de los perfiles de disolución entre el producto multifuente y el producto de referencia.

La demostración de equivalencia requiere de estudios in vivo, por ejemplo para principios activos de alto riesgo sanitario y estrecho rango terapéutico, o de estudios de equivalencia in vitro, para aquellos principios activos que cumplen determinados requisitos de solubilidad y permabilidad, de acuerdo con el *Sistema de clasificación biofarmacéutica* y además poseen amplio margen terapéutico.

Otro de los requisitos sumamente importantes de los productos multifuente involucra los procedimientos y prácticas empleadas en la manufactura, almacenamiento y distribución de esos productos los cuales deben llevarse a cabo de acuerdo a los estándares de las Buenas Prácticas de Manufactura de manera de asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los mismos durante todo su período de vida útil.

Para algunos productos, por ejemplo las formulaciones parenterales de compuestos altamente solubles en agua, la seguridad y eficacia es adecuadamente garantizada por la implementación de las Buenas Prácticas de Manufactura, por el cumplimiento de los estándares de calidad y por las especificaciones de Farmacopea. Para otra clase de productos, incluyendo muchos de origen biológico, tales como vacunas, suero animal, productos derivados de sangre y plasma humano y productos elaborados por biotecnología, se plantean otras consideraciones que no están incluidas en este capítulo.

Por último, resulta de fundamental importancia que los productos de referencia empleados en los estudios comparativos (in vivo e in vitro) sean válidos y confiables, sustentando dichas cualidades con el aporte de datos que garanticen la calidad, seguridad y eficacia del producto seleccionado.

Definiciones

Alternativa farmacéutica

Los productos son alternativas farmacéuticas si ellos contienen la misma cantidad molar de principio activo, pero difieren en la forma farmacéutica (por ejemplo comprimidos, cápsulas) o en la forma química (por ejemplo sal, éster). Las alternativas farmacéuticas proveen la misma cantidad de porción activa por la misma vía de administración, pero no son equivalentes farmacéuticos. Ellos pueden o no ser equivalentes terapéuticos.

Alto riesgo sanitario

Es la probabilidad de aparición de complicaciones amenazantes de la enfermedad para la vida o para la integridad psicofísica de la persona y/o de reacciones adversas graves (muerte, hospitalización del paciente, prolongación de la hospitalización, discapacidad significativa o persistente, incapacidad o amenaza de muerte), cuando la concentración sanguínea del principio activo no se encuentra dentro de la ventana terapéutica.

Biodisponibilidad

En sentido amplio, velocidad y cantidad con la cual el principio activo es absorbido desde la forma farmacéutica y se encuentra disponible en forma inalterada en el/los sitio/s de acción. En la mayoría de los casos no es posible medir la concentración de principio activo en el/los sitio/s de acción. No obstante, se considera que la concentración del principio activo en la circulación general se encuentran en equilibrio con la concentración en el/los sitio/s de acción. La Biodisponibilidad puede, entonces, ser definida como la velocidad y cantidad (tasa y grado de disponibilidad) con la cual el principio activo es absorbido desde la forma farmacéutica y se encuentra disponible en forma inalterada en la circulación general. Se asume, en consecuencia, que en un mismo individuo, una concentración plasmática esencialmente similar en el curso del tiempo, resultará en una concentración esencialmente similar en el sitio de acción.

Bioequivalencia

Dos productos farmacéuticos son bioequivalentes si son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas y su biodisponibilidad (tasa y grado de disponibilidad), después de su administración en la misma dosis molar, es semejante a tal punto que cabe prever que sus efectos serán esencialmente los mismos. La Bioequivalencia se focaliza sobre la equivalencia de la liberación de principio activo

desde el producto y la subsiguiente absorción en la circulación sistémica.

Equivalencia farmacéutica

Dos especialidades medicinales son equivalentes farmacéuticos si contienen la misma cantidad molar de principio activo en la misma forma farmacéutica, están destinados a ser administrados por la misma vía y cumplen con estándares de calidad idénticos o comparables. Sin embargo, la equivalencia farmacéutica no necesariamente implica equivalencia terapéutica ya que diferencias en los excipientes, en el proceso de elaboración, u otras pueden determinar disparidades en el comportamiento de los productos.

Equivalencia terapéutica

Dos productos son terapéuticamente equivalentes si ellos son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas y después de la administración en la misma dosis molar, sus efectos, con respecto a eficacia y seguridad, serán esencialmente los mismos cuando sean administrados a pacientes por la misma vía de administración bajo las condiciones especificadas en el prospecto. La equivalencia terapéutica puede ser demostrada por estudios adecuados de equivalencia, sean estos farmacocinéticos, farmacodinámicos, clínicos o in-vitro.

Estrecho rango terapéutico

Son aquellos principios activos que presentan alguna de las características siguientes:

a) La relación entre la dosis letal media DL_{50} y la dosis efectiva media DE_{50} es menor de 2.

b) La relación entre la mínima concentración tóxica y la mínima concentración efectiva es menor de 2.

c) El uso seguro y efectivo del producto que contiene el principio activo en cuestión requiere una cuidadosa dosificación y monitoreo del paciente.

Estudios de equivalencia

Son estudios que permiten inferir la equivalencia terapéutica entre el producto multifuente y el producto de referencia, empleando metodología in vivo o in vitro.

Estudios de equivalencia in vitro

Estudios de disolución in-vitro para obtener la similaridad de los perfiles de disolución entre el producto multifuente y el producto de referencia en tres medios diferentes: pH 1,2; pH 4,5 y pH 6,8.

Producto de referencia

El producto de referencia es normalmente el producto innovador para el cual la seguridad, eficacia y calidad han sido establecidas. Cuando el producto innovador no se encuentre disponible localmente, o bien se encuentre disponible pero no haya demostrado su equivalencia terapéutica con el producto innovador registrado en el país de origen, el líder del mercado puede ser utilizado como producto de referencia cuando su eficacia, seguridad y calidad hayan sido establecidas y documentadas, o el que la autoridad sanitaria determine para cada caso.

Producto innovador

Generalmente el producto farmacéutico innovador es aquél que fue autorizado por primera vez en su país de origen, sobre la base de documentación de calidad, seguridad y eficacia.

Productos multifuente

Productos farmacéuticos de fuentes múltiples (diferentes productores) son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas que pueden o no haber demostrado equivalencia terapéutica. Los productos farmacéuticos de fuentes múltiples, que hayan demostrado equivalencia in vivo o in vitro, se consideran terapéuticamente equivalentes al producto de referencia.

Sistema de clasificación biofarmacéutica

Es un marco científico para clasificar principios activos sobre la base de su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal. Cuando se cumplen determinados criterios de solubilidad, permeabilidad y velocidad de disolución del medicamento el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, (aplicable sólo a la forma farmacéutica sólida oral de liberación inmediata), puede ser usado como una herramienta para justificar la demostración de equivalencia mediante estudios in vitro (bioexcepciones).

1040. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

Los estudios de estabilidad se efectúan para determinar el periodo de tiempo y las condiciones de almacenamiento en las cuales las materias primas y las preparaciones oficiales se mantienen dentro de las especificaciones sobre identidad, potencia, calidad y pureza, establecidas en las monografías de esta Farmacopea.

La estabilidad de los productos farmacéuticos, en su envase primario final, debe ser demostrada mediante el empleo de métodos apropiados. Los procedimientos analíticos empleados deben permitir determinar la sustancia en presencia de sus productos de degradación. Deben considerarse los cambios en sus propiedades físicas a lo largo del tiempo.

La estabilidad de una sustancia o un producto farmacéutico puede verse afectada por las condiciones de almacenamiento (temperatura, luz, aire y humedad), así como por su interacción con el envase. Las condiciones bajo las que se ha fijado la fecha de vencimiento deben figurar en el rótulo. Estas condiciones de almacenamiento deben mantenerse durante la distribución de la sustancia o producto farmacéutico, es decir desde el momento de la entrega por parte del elaborador hasta la fecha de vencimiento.

El mundo se halla dividido en cuatro *Zonas climáticas*. Los estudios de estabilidad deben orientarse para la región donde serán destinados considerando la zona climática estipulada; nuestro país se encuentra en Zona II.

OBJETIVO

El propósito de un estudio de estabilidad es establecer el periodo de tiempo en el cual las propiedades de las sustancias y/o productos farmacéuticos se mantienen dentro de sus especificaciones bajo la influencia de una variedad de factores ambientales tales como temperatura, humedad y luz, los demás componentes de la formulación y sus envases, permitiendo determinar las condiciones de almacenamiento, periodos de reanálisis y un periodo de vida útil.

DEFINICIONES

Datos primarios de estabilidad - Son los datos analíticos obtenidos de la sustancia o el producto farmacéutico en estudio, almacenado en el envase primario definitivo bajo condiciones de almacenamiento fijadas, que permiten fijar la frecuencia de los controles o el periodo de vida útil propuesto.

Degradación forzada - Estos estudios se llevan a cabo para obtener datos sobre los productos y mecanismos de descomposición de la sustancia y verificar la aptitud de los métodos analíticos propuestos. Su naturaleza depende del tipo de sustancia y producto farmacéutico. Los ensayos pueden realizarse sobre un único lote de material e incluir el efecto de temperaturas superiores a las condiciones elegidas para el estudio acelerado, por ej., en incrementos de 10 °C (50, 60, etc.), el efecto de la humedad (por ej., 75 % o mayor), oxidación y fotólisis y su susceptibilidad a la hidrólisis a distintos valores de pH.

Escala piloto - Procedimiento representativo del que se aplica en escala de producción.

Lote piloto - Lote producido para fines experimentales, generalmente de menor tamaño que el lote de producción. Puede elaborarse para destinarlo a estudios de estabilidad, desarrollo, etc.

Estudio de estabilidad acelerado - Estudio diseñado para aumentar la velocidad de degradación química o cambios en las propiedades físicas de una sustancia o un producto farmacéutico, empleando condiciones de almacenamiento extremas. Estos estudios tienen como objeto determinar los parámetros cinéticos de los procesos de degradación o predecir la vida útil del producto farmacéutico en condiciones normales de almacenamiento. Los resultados de los estudios acelerados deben ser complementados por los estudios de estabilidad de larga duración. Estos datos pueden también emplearse para evaluar efectos químicos a largo plazo en condiciones no aceleradas y para evaluar el impacto de desviaciones de corta duración de las condiciones de almacenamiento declaradas en el rótulo, como las que pueden ocurrir durante el transporte y distribución. Los resultados de estudios acelerados no siempre predicen los cambios físicos.

Estudio de larga duración (en tiempo real) - Estudio diseñado para la evaluación de las características de estabilidad física, química, biológica y microbiológica de un producto farmacéutico o una sustancia bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas, que cubre todo el periodo de vida útil o el periodo de reanálisis propuesto.

Fecha de reanálisis - Fecha en que se debe realizar un nuevo análisis para verificar que la sustancia o producto farmacéutico es aún apropiado para su uso.

Fecha de vencimiento - Fecha proporcionada por el elaborador; se basa en los estudios de estabilidad del producto farmacéutico después de la cual el mismo no debe emplearse. El producto debe cumplir durante todo este periodo con las especificaciones dadas en esta Farmacopea.

Zonas climáticas - Se refiere al concepto de dividir al mundo en cuatro zonas para las cuales se definen las condiciones climáticas que prevalecen.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD SOBRE SUSTANCIAS

Procedimientos y criterios - Los ensayos deben cubrir todas las características que puedan modificarse durante el almacenamiento, además de aquéllas que tengan influencia sobre la identidad, potencia, calidad y pureza de la sustancia.

Los estudios de estabilidad deben cubrir las características físicas, químicas y microbiológicas de la sustancia. Deben aplicarse métodos indicadores de estabilidad validados.

Los estudios de estabilidad acelerados se llevan a cabo sobre un lote piloto y, el de larga duración, sobre por lo menos tres lotes pilotos debiendo cubrir un mínimo de 12 meses.

Especificaciones - Los límites de aceptación deben definirse a partir del material empleado en los ensayos preclínicos, clínicos o los utilizados en el desarrollo del producto. Se deben incluir límites máximos individuales y totales para productos de degradación e impurezas.

En la *Tabla* se indican las condiciones de estudios de larga duración, acelerados y tiempos mínimos. En caso de que se exija el estudio de estabilidad de una sustancia, debe presentarse un estudio de larga duración de no menos de doce meses sobre por lo menos tres lotes y se deben tomar, luego de la presentación hecha para el registro, los datos que cubran todo el periodo que se solicita para el reanálisis, para remitirlos a la Autoridad Sanitaria si es que ésta lo solicita. El estudio de estabilidad acelerado es optativo.

Condiciones de almacenamiento durante el estudio - La duración del estudio y las condiciones de almacenamiento deben ser suficientes para cubrir la distribución, almacenamiento y periodo de uso subsiguiente de la sustancia. La aplicación de las mismas condiciones de almacenamiento empleadas para el estudio del producto farmacéutico facilita la evaluación y revisión comparativa de los resultados.

Cuando se producen cambios significativos durante los 6 meses de almacenamiento bajo las condiciones del estudio acelerado, deben realizarse estudios adicionales en condiciones intermedias (por ej., 30 ± 2 °C / 60 ± 5 % HR). Un cambio significativo a 40 °C / 75 % HR o a 30 °C / 60 % HR se define como la falta de cumplimiento de las especificaciones.

Los datos (de estudios acelerados o en condiciones intermedias) pueden emplearse para evaluar el impacto de las variaciones en las condiciones de almacenamiento declaradas en el rótulo, que pueden producirse durante la distribución y el almacenamiento.

Frecuencia de los ensayos - Para los estudios de larga duración, la frecuencia de ensayo debe ser suficiente para establecer las características de estabilidad de la sustancia. Para estudios de sustancias con un periodo de reanálisis de por lo menos 12 meses, en el ensayo de larga duración se establece un ensayo cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo año y luego anualmente. Se recomienda, para los estudios acelerados de 6 meses, un mínimo de tres puntos que incluyan los puntos inicial y final.

Envases - Los envases que se utilicen en los estudios de estabilidad de larga duración deben ser iguales a los envases a utilizar para la distribución de la sustancia. En el caso de envases de gran capacidad, pueden emplearse envases de las mismas características pero de menor tamaño.

Evaluación - El grado de variabilidad de los lotes individuales compromete las extrapolaciones que deban hacerse sobre los futuros lotes de producción con respecto al cumplimiento de las especificaciones hasta la fecha de reanálisis.

Una aproximación aceptable para los atributos cuantificables, que disminuyen con el tiempo, consiste en determinar el tiempo en el cual el límite inferior del intervalo de confianza ($p = 95$ %) para la curva de degradación media se intercepte con el límite inferior del intervalo de aceptación. Si se trata de una propiedad cuantificable que aumenta con el tiempo, se determina el tiempo al cual el límite superior del intervalo de confianza ($p = 95$ %) para la curva de degradación media se intercepte con el límite superior del intervalo de aceptación. Si el análisis muestra que la variabilidad lote a lote es pequeña, resulta ventajoso combinar los datos en una estimación total; ésto puede realizarse aplicando ensayos estadísticos apropiados. Si no es apropiado combinar datos de varios lotes, el periodo de reanálisis puede determinarse a partir del lote que se mantenga dentro de las especificaciones del tiempo menor.

La naturaleza de las degradaciones determina la necesidad de una transformación de los datos para el

análisis de regresión lineal. Comúnmente, la relación puede ser representada por una función lineal, cuadrática o cúbica sobre una escala aritmética o logarítmica. E s aconsejable emplear métodos estadísticos para ensayar la bondad del ajuste de los datos sobre todos los lotes y lotes combinados (cuando corresponda) de las curvas o rectas obtenidas.

En algunos casos, es posible extrapolar los datos del estudio de larga duración más allá del periodo de observación, para extender el periodo de reanálisis, particularmente cuando los datos del estudio acelerado apoyan esta posibilidad, la bondad del ajuste de cualquier modelo matemático, el tamaño del lote, la existencia de otros datos de estabilidad, el conocimiento del mecanismo de degradación, etc. En estos casos se supone que las características cinéticas de la degradación permanecen invariables más allá de los datos observados, esta circunstancia debe demostrarse al justificar cualquier extrapolación.

Rotulado - Sobre la base de la evaluación de la estabilidad de la sustancia, debe establecerse un intervalo de temperaturas de almacenamiento de acuerdo con los requisitos establecidos. C uando corresponda, deben establecerse requisitos específicos particularmente para sustancias que no admiten el congelamiento.

Como resultado de la información obtenida a partir del estudio de estabilidad, debe indicarse la fecha de reanálisis.

ESTUDIOS DE ESTABILIDAD SOBRE PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

Procedimientos y criterios - El diseño del programa de estabilidad para un producto farmacéutico debe hacerse sobre la base de la información obtenida durante los estudios de preformulación y formulación. Se deben estimar los cambios que pueden ocurrir durante el almacenamiento y sobre esta base seleccionar las variables de la formulación a es tudiar durante el ensayo. La información de estabilidad tanto en los estudios de estabilidad acelerado como en los de larga duración debe obtenerse sobre tres lotes piloto de la misma formulación y concentración en los envases primarios definitivos. Cuando sea posible, los lotes del producto deben elaborarse empleando lotes diferentes de sustancia.

Los ensayos deben cubrir todos los atributos que puedan modificarse durante el almacenamiento y aquéllos que tengan influencia sobre la calidad, seguridad y eficacia. Los procedimientos analíticos deben validarse y ser indicadores de la estabilidad. La necesidad y el grado de las repeticiones dependen de los resultados de los estudios de validación.

Los ensayos a realizar durante el estudio deben cubrir no solamente la estabilidad química y biológica sino también los cambios en las propiedades físicas y características organolépticas, atributos microbiológicos y ensayos funcionales. Deben determinarse además, el mantenimiento de la concentración y eficacia de los conservantes mediante ensayos y valoraciones apropiadas.

Especificaciones - Los criterios de aceptación del periodo de vida útil deben determinarse considerando toda la información de estabilidad disponible.

Cuando corresponda, se deben incluir los límites máximos para los productos de degradación y para otras determinaciones, por ejemplo límites máximos o mínimos para tamaño de partícula o velocidad de disolución.

En la *Tabla* se indican las condiciones y tiempos mínimos de estudios de larga duración y acelerados. Los estudios de larga duración son obligatorios. Deben tener un mínimo de doce meses de duración para su presentación para el registro aunque deben continuarse hasta cubrir el periodo de vida útil propuesto y quedar a disposición de la Autoridad Sanitaria. El estudio de estabilidad acelerado y los de condición intermedia son optativos, pero pueden emplearse para evaluar el efecto de periodos cortos de no cumplimiento de las condiciones de almacenamiento fijadas (por ej., durante la distribución).

Puede ser necesario aplicar consideraciones especiales para los productos que cambien física o químicamente a bajas temperaturas, por ej., las suspensiones o emulsiones que pueden sedimentar o separarse, los aceites y las preparaciones semisólidas que pueden aumentar su viscosidad. C uando se emplean bajas temperaturas, el ensayo acelerado de seis meses deberá efectuarse a una temperatura por lo menos 15 °C por encima de la temperatura designada para el estudio de larga duración, junto con condiciones apropiadas de humedad relativa para esa temperatura. Por ej., para un producto que debe ser almacenado bajo refrigeración, el ensayo acelerado deberá realizarse a 25 ± 2 °C / 60 ± 5 % HR.

Condiciones de almacenamiento durante el estudio - La duración del estudio y las condiciones de almacenamiento deben ser suficientes para cubrir la distribución, almacenamiento y periodo de uso subsiguiente (por ej., la reconstitución o la dilución según se indique en el rótulo). E n el caso de productos que deben ser reconstituidos para su administración, se deben establecer las condiciones de almacenamiento y las correspondientes fechas de vencimiento para el producto antes y después de reconstituido.

El almacenamiento bajo condiciones de humedades relativas altas se aplica particularmente a productos farmacéuticos sólidos. Para productos tales como soluciones, suspensiones, etc., contenidos en envases diseñados para proveer una barrera permanente a la pérdida de agua, el almacenamiento específico bajo condiciones de humedad relativa alta no es necesario, pero debe aplicarse el mismo intervalo de temperaturas. La humedad relativa baja (por ej., 10 a 20 % HR) puede afectar adversamente a productos envasados en envases semipermeables (por ej., soluciones en bolsas plásticas, gotas nasales en envases plásticos pequeños, etc.) y debe considerarse la realización del ensayo bajo tales condiciones.

Cuando se producen cambios significativos durante el estudio acelerado, deben realizarse estudios adicionales en condiciones intermedias (por ej., 30 ± 2 °C / 60 ± 5 % HR. Un cambio significativo en un estudio acelerado puede definirse como:

1. una pérdida del 5 % de potencia del valor inicial de valoración de un lote;
2. cualquier producto de degradación que exceda los límites establecidos;
3. el producto excede sus límites de pH;
4. los resultados del ensayo de disolución están fuera de los límites especificados;
5. el producto no cumple con las especificaciones de apariencia y propiedades físicas como color, se produce separación de fases, suspendibilidad, dureza, etc.

Frecuencia de los ensayos - La frecuencia de los ensayos debe ser suficiente para establecer las características de estabilidad del producto.

Para estudios de larga duración, se establece un ensayo cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo año y luego anualmente. Los estudios acelerados deben ensayarse en un mínimo de tres tiempos, incluyendo los puntos iniciales y finales.

Envases - El estudio debe efectuarse en el envase primario definitivo.

Evaluación - Debe adoptarse un enfoque sistemático para la presentación y la evaluación de la información de estabilidad que debe cubrir, según corresponda, características físicas, químicas, biológicas y microbiológicas, incluyendo propiedades particulares del producto farmacéutico (por ej. velocidad de disolución para las formas sólidas de uso oral).

El grado de variabilidad de los lotes individuales compromete en cierta medida las extrapolaciones que deban hacerse sobre los futuros lotes de producción con respecto al cumplimiento de las especificaciones hasta la fecha de vencimiento.

Un enfoque aceptable para los atributos cuantificables que se supone deben disminuir con el tiempo, consiste en determinar el tiempo al cual el límite inferior del intervalo de confianza (p = 95 %) para la curva de degradación media intercepte el límite inferior del intervalo de aceptación. Para los atributos que aumentan con el tiempo, se determina el tiempo al cual el límite superior del mismo intervalo de confianza intercepte el límite superior del intervalo de aceptación. Si el análisis muestra que la variabilidad lote a lote es pequeña, es ventajoso combinar los datos en una estimación total, y ésto puede realizarse aplicando ensayos estadísticos apropiados. Si no es apropiado combinar datos de varios lotes, la vida útil puede determinarse a partir del lote que se haya mantenido dentro de las especificaciones durante el menor tiempo.

La naturaleza de las degradaciones determinará la necesidad de la transformación de los datos para el análisis de regresión lineal. Comúnmente, la relación puede ser representada por una función lineal, cuadrática o cúbica sobre una escala aritmética o logarítmica. Es aconsejable emplear métodos estadísticos para probar la bondad del ajuste de los datos sobre todos los lotes y lotes combinados (cuando corresponda) de las rectas o curvas obtenidas.

En caso de omitir el análisis estadístico, debe proveerse una justificación detallada de tal decisión.

Tabla.

TIPO DE ESTUDIO	TEMPERATURA	HUMEDAD	TIEMPOS MÍNIMOS
Estudios de larga duración	25 ± 2 °C	60 ± 5 %	12 meses
Estudios acelerados	40 ± 2 °C	75 ± 5 %	6 meses

Actualización total

1050. FORMAS FARMACEUTICAS

En este capítulo se establecen las definiciones de las formas farmacéuticas y los principios generales para la elaboración de algunas de ellas.

Forma Farmacéutica: Es el producto proveniente de la transformación de un principio activo o de una asociación de los mismos mediante procedimientos fármacotécnicos, a fin de conferirles características físicas y morfológicas particulares para su adecuada dosificación y conservación, y que faciliten su administración y acción farmacológica.

AEROSOLES

Los aerosoles farmacéuticos son soluciones o dispersiones conteniendo principios activos que se envasan bajo presión y que se liberan con la activación de una válvula apropiada. Están destinados a la aplicación sobre la piel y la aplicación local en las vías aéreas superiores (aerosoles nasales), la cavidad oral (aerosoles bucales y sublinguales) o los pulmones (aerosoles para inhalación).

El término aerosol se aplica corrientemente a los productos presurizados que liberan su contenido en forma de una fina niebla, espumas o líquidos semisólidos.

En los *Aerosoles para inhalación*, el tamaño de partícula debe ser controlado cuidadosamente y su diámetro medio debe ser menor de 10 µm (ver *390. Ensayos farmacotécnicos para aerosoles*).

Los productos que emplean válvula dosificadora se conocen como aerosoles dosificadores.

Un sistema de aerosol consta de: envase, propelente, concentrado que contiene el principio activo o principios activos, válvula y disparador. La naturaleza de estos componentes determina características tales como la distribución de tamaños de partícula, uniformidad de la dosis (para aquellos con válvulas dosificadoras), velocidad de descarga, densidad de la espuma o viscosidad del líquido.

Tipos de aerosoles - En general, los aerosoles están constituidos por sistemas de dos fases (gas y líquido) o tres fases (gas, líquido y sólido o líquido).

Los aerosoles de dos fases contienen una solución del o los principios activos en el propelente licuado que puede ir acompañado por cosolventes como alcohol, propilenglicol y polietilenglicoles, en equilibrio con el propelente vaporizado, mientras que los sistemas de tres fases contienen una suspensión o emulsión del los principios activos.

En las suspensiones el o los principios activos pueden dispersarse en el propelente con la ayuda de excipientes apropiados, como agentes humectantes y/o soportes sólidos como talco o sílice coloidal.

Una espuma en aerosol es una emulsión que contiene uno o varios principios activos, agentes tensioactivos, líquidos acuosos o no acuosos y propelentes. Si el propelente está en la fase interna (es decir, una emulsión del tipo aceite en agua) se descarga una espuma estable y si el propelente está en la fase externa (es decir, una emulsión del tipo agua en aceite) se obtiene un líquido pulverizable o una espuma que pierde sus características rápidamente después de la descarga.

Propelentes - Su función principal es proporcionar la presión necesaria dentro del sistema para expulsar el contenido del envase, mientras que la fracción licuada es uno de los componentes de la fase líquida. Los propelentes empleados incluyen diversos hidrocarburos, especialmente derivados del metano, etano y propano e hidrocarburos de bajo peso molecular, como butanos y pentanos y gases comprimidos como dióxido de carbono, nitrógeno y óxido nitroso. Los mismos deben ser autorizados por la Autoridad Sanitaria. Con frecuencia se emplean mezclas de propelentes para obtener las características farmacotécnicas del aerosol.

Válvulas - Regulan el flujo del contenido que se libera. En la mayoría de los aerosoles se emplean válvulas que operan en forma continua. Sin embargo, los aerosoles para inhalación oral o nasal a menudo emplean válvulas dosificadoras, las que permiten liberar una dosis predeterminada con cada activación, la que debe estar dentro de las tolerancias especificadas en *<390>. Ensayos farmacotécnicos para aerosoles.*

Disparador - Adaptador adjuntado al vástago de la válvula que cuando se oprime o se mueve abre la válvula y permite dirigir el aerosol al área deseada.

Envases - Se emplean envases de vidrio, plástico o metal, o una combinación de estos materiales. Los envases de vidrio deben proporcionar seguridad y resistencia a la presión y los golpes. Se pueden emplear plásticos para recubrir los envases de vidrio y obtener mayor seguridad o en el caso envases de metálicos para mejorar la resistencia a la corrosión y la estabilidad de la formulación.

Elaboración - Los aerosoles son elaborados por dos métodos generales.

En el método de llenado en frío, el concentrado (enfriado a una temperatura por debajo de 0 °C) y el propelente refrigerado se introducen en envases abiertos (enfriados). La válvula y el disparador son luego engarzados sobre el envase para formar un sello de cierre perfecto. Durante el intervalo entre el agregado del propelente y el sellado del envase, el propelente se volatiliza lo suficiente como para desplazar el aire del envase.

En el método de llenado a presión, el concentrado se introduce en el envase, éste se cierra y el propelente se introduce bajo presión a través del orificio de la válvula. En este caso, deben tomarse medidas para evacuar el aire, aplicando vacío o desplazándolo con una cantidad apropiada de vapor del propelente.

Los controles durante el proceso de elaboración incluyen: control de la formulación, peso de llenado del propelente, control de las presiones y ensayo de pérdida en el aerosol terminado. Los aerosoles deben cumplir con las especificaciones indicadas en *<390>. Ensayos farmacotécnicos para aerosoles*.

Sustancias extraibles - La composición y la calidad de los materiales empleados en la elaboración de los componentes de las válvulas (como por ej. vástago, juntas, etc.) deben seleccionarse con cuidado debido a que en la formulación de aerosoles se emplean solventes orgánicos como propelentes o vehículos que pueden extraer materiales de los componentes elastoméricos y plásticos a la formulación. Las sustancias extraibles, entre las cuales se pueden incluir hidrocarburos aromáticos, nitrosaminas, aceleradores de vulcanización, antioxidantes, plastificantes, monómeros, etc., deben identificarse y minimizarse en lo posible.

CAPSULAS

Las cápsulas son formas farmacéuticas sólidas que contienen el principio activo solo o acompañado por excipientes dentro de una cubierta soluble rígida o blanda. Generalmente la gelatina es el componente principal de las paredes de las cápsulas. Los tamaños de las cápsulas se designan mediante escala numérica desde el N° 5, el más pequeño, al N° 000, que es el más grande:

Las cápsulas rígidas pueden contener colorantes como, óxidos de hierro, agentes opacantes como dióxido de titanio, dispersantes, agentes de endurecimiento como la sacarosa y conservantes. Contienen normalmente entre 10 y 15% de agua.

Las cápsulas rígidas se llenan con polvos o gránulos. Generalmente las formulaciones contienen excipientes, lubricantes y deslizantes para facilitar el llenado. También pueden agregarse desintegrantes, para facilitar la disgregación y dispersión en el tracto digestivo. Cuando el principio activo es hidrofóbico pueden agregarse agentes humectantes.

La formulación, el método de llenado y el grado de compactación influyen en la velocidad de liberación de los principios activos.

Las cápsulas blandas, preparadas a partir de gelatina u otro material apropiado requieren métodos de producción en gran escala. Las paredes de las cápsulas blandas de gelatina son más gruesas que en las cápsulas rígidas y pueden ser plastificadas mediante el agregado de un polialcohol como sorbitol o glicerina. La relación entre plastificante anhidro y gelatina seca determina la plasticidad y dureza y permite adecuarlas a las condiciones ambientales o a la naturaleza del contenido. La composición de las cápsulas blandas puede incluir colorantes aprobados, agentes opacantes como dióxido de titanio, saborizantes y conservantes. Las cápsulas blandas contienen normalmente entre 6 y 13% de agua. En la mayoría de los casos, las cápsulas blandas se llenan con líquidos, aunque pueden llenarse con sólidos particulados empleando equipos apropiados. Los principios activos se pueden disolver o se suspender en vehículos oleosos, como por ej., aceite vegetal, sin embargo, los vehículos no acuosos, miscibles con agua, como por ej., polietilenglicol de bajo peso molecular son más comúnmente empleados debido a que presentan menores problemas de biodisponibilidad.

Los sellos, son un tipo de cápsulas de almidón de poco uso en la actualidad. Su empleo esta limitado a la preparación de ciertas fórmulas magistrales con polvos muy voluminosos. Sus tamaños se designan mediante escala numérica desde el N° 00, el más pequeño, al N° 2 que es el más grande.

Cápsulas con cubierta entérica - Las cápsulas o los gránulos encapsulados pueden recubrirse para resistir la liberación del principio activo en el fluido gástrico cuando es importante evitar problemas potenciales de inactivación del principio activo o la irritación de la mucosa gástrica. El término liberación retardada se emplea en las monografías para las cápsulas y los gránulos con cubierta entérica que están destinadas a retardar la liberación del principio activo hasta que la cápsula y gránulos encapsulados haya pasado a través del estómago.

Cápsulas de liberación prolongada - Se formulan de tal manera que la liberación del principio activo se produzca durante un período de tiempo prolongado después de su administración. Las expresiones como *acción prolongada*, *acción extendida* y *liberación sostenida* también se han empleado para describir tales formas farmacéuticas. Sin embargo, para los fines farmacopeicos y requisitos para la liberación de principios activos (ver *530.*

Liberación de principios activos) se emplea el término *liberación prolongada.*

COMPRIMIDOS

Los comprimidos son formas farmacéuticas sólidas que contienen uno o más principios activos generalmente acompañados por excipientes apropiados y se administran por diferentes vías. Se preparan mediante la aplicación de altas presiones sobre polvos o granulados, empleando equipos mecánicos provistos de matrices y punzones apropiados.

En la formulación de comprimidos generalmente se emplean como excipientes diluyentes, aglutinantes, desintegrantes y lubricantes. También pueden estar presentes colorantes y saborizantes.

Elaboración - Se emplean tres métodos generales de elaboración: granulación húmeda, granulación seca y compresión directa.

Los comprimidos deben cumplir con las especificaciones descriptas en *<740>. Uniformidad de unidades de dosificación*, *<310>. Ensayo de disgregación* y *<320>. Ensayo de disolución*.

Los comprimidos pueden recubrirse para proteger sus componentes de los efectos del aire, la humedad o la luz, enmascarar sabores u olores desagradables, mejorar la apariencia y controlar el sitio de liberación del principio activo en el tracto gastrointestinal.

Comprimidos con cubiertas simples - En algunos casos, los comprimidos se recubren con azúcar (grageas) que se aplica por medio de suspensiones acuosas. Los comprimidos recubiertos luego son pulidos mediante la aplicación de soluciones diluidas de cera en solventes como cloroformo o mezclas de polvos. Los revestimientos que constan de sustancias como goma laca o acetoftalato de celulosa a menudo se aplican con solventes no acuosos antes de la aplicación de la cubierta azucarada.

Comprimidos, con cubierta entérica - Cuando el principio activo ‘puede destruirse o inactivarse por el jugo gástrico o cuando puede irritar la mucosa gástrica, se indica el empleo de los revestimientos entéricos. Estos revestimientos están destinados a retardar la liberación del principio activo hasta que el comprimido haya pasado a través del estómago. En esta Farmacopea se emplea el término *liberación retardada* y las monografías correspondientes incluyen ensayos y especificaciones para la liberación del principio activo (ver *530. Liberación de principios activos*).

Comprimidos de liberación prolongada - Se formulan de tal manera que la liberación del principio activo se produzca durante un período prolongado de tiempo después de la administración. Las expresiones como *liberación extendida*, *acción prolongada*, *acción repetida* y *liberación sostenida* también se emplean para describir tales formas farmacéuticas. Sin embargo, el término *liberación prolongada* se emplea para los fines farmacopeicos y los requisitos para la liberación de principios activos se especifican en las monografías correspondientes.

CREMAS

Son formas farmacéuticas semisólidas emulsionadas que contienen uno o varios principios activos y hasta un 80 % de agua. Este término se ha aplicado tradicionalmente a los semisólidos que poseen una consistencia relativamente fluida formulados ya sea como una emulsión agua en aceite o aceite en agua. Sin embargo, más recientemente el término ha estado restringido a los productos que consisten en emulsiones aceite en agua o dispersiones acuosas microcristalinas de ácidos grasos o alcoholes de cadena larga que son fácilmente lavables, cosmética y estéticamente más aceptables.

ELIXIRES

Ver *Soluciones*.

EMULSIONES

Son sistemas de al menos dos fases en los cuales un líquido se dispersa en otro líquido en la forma de glóbulos o gotitas pequeñas. Cuando el aceite es la fase dispersa y la fase continua es la acuosa, el sistema se designa como una emulsión aceite en agua. Por el contrario, cuando el agua o una solución acuosa es la fase dispersa y un aceite o material oleoso es la fase continua, el sistema se designa como una emulsión agua en aceite. Las emulsiones se estabilizan mediante agentes que impiden la coalescencia.

En las emulsiones aceite en agua, se agregan polímeros hidrofílicos naturales o sintéticos junto con los agentes tensioactivos. Estas sustancias se acumulan en la interfase y aumentan la viscosidad de la fase acuosa por lo cual disminuyen la velocidad de la formación de agregados.

Todas las emulsiones requieren un agente antimicrobiano porque la fase acuosa es favorable al crecimiento de los microorganismos.

EXTRACTOS

Son formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y plásticas o sólidas y pulverulentas, obtenidas por agotamiento de drogas vegetales o animales con solventes apropiados, que luego se evaporan parcial

o totalmente, ajustando el residuo a tipos determinados para cada droga.

Por su consistencia se clasifican en *Extractos fluidos*; *Extractos firmes* o *pilulares* y *Extractos secos* o *pulverizados*.

Los extractos firmes y los secos de una misma droga, deberán contener la misma cantidad de principios activos.

La preparación de los extractos comprende dos operaciones principales: la obtención del líquido extractivo y su concentración. Ambas se practicarán según procedimientos que varían de acuerdo con las características de la droga.

Obtenido el extracto, que se realizará por percolación, maceración u otro procedimiento, se concentrará hasta la consistencia indicada en cada caso, evitando la acción prolongada del calor, así como una temperatura alta. En general deberá preferirse la destilación del disolvente con presión reducida, a temperatura inferior a 50 ºC.

Todos los extractos que contengan principios activos enérgicos deberán ser valorados y ajustados a un tipo determinado para cada droga. Para ello deberán emplearse como diluentes sustancias inertes.

Si la droga contiene sustancias grasas solubles en el disolvente a emplear, es necesario adoptar algún procedimiento que permita eliminarlas, con lo cual se facilitarán las manipulaciones ulteriores y, a la vez, la conservación del extracto.

El rótulo deberá indicar: nomenclatura de la droga usada; si es un *extracto fluido, firme* o *seco*; el disolvente o disolventes empleados; si se empleó droga desecada o fresca; si se agregaron excipientes, estabilizantes o agentes antimicrobianos, cuáles y en qué proporción. Además se deberá especificar: el porcentaje de residuo seco; y el porcentaje de alcohol en el extracto final en los extractos fluidos.

GELES

Son sistemas semisólidos con un alto contenido acuoso o hidroalcohólico y baja o media viscosidad conferida por un agente gelificante. Cuando la masa del gel consta de una red de partículas discretas pequeñas, el gel se clasifica como un sistema de dos fases (como por ej., *Gel de hidróxido de aluminio*), mientras que, si el tamaño de partícula de la fase dispersa es relativamente grande, generalmente se denomina magma (como por ej., *Magma de bentonita*). Tanto geles como magmas suelen ser tixotrópicos, siendo semisólidos en reposo y tornándose líquidos al agitarlos. Deben ser agitados antes de su uso para asegurar la homogeneidad y deben rotularse a ese efecto. (Ver *Suspensiones*.)

Los geles que se visualizan como una sola fase generalmente contienen macromoléculas orgánicas distribuidas uniformemente en todo el líquido de tal manera que no existe ningún límite evidente entre las macromoléculas dispersas y el líquido. Los geles de una sola fase pueden prepararse con macromoléculas sintéticas o con gomas naturales. Estos últimos también se llaman mucílagos.

IMPLANTES (*PELLETS*)

Son masas sólidas estériles pequeñas que contienen un principio activo altamente purificado (con o sin excipientes), preparados mediante compresión o moldeado. Están destinados para obtener una liberación continua del principio activo durante largos períodos de tiempo.

INYECTABLES

Son productos fluidos formulados para ser administrados a través de piel o mucosas. Estos productos se deben preparar mediante procedimientos que garanticen el cumplimiento de los requisitos establecidos por la Farmacopea para esterilidad, piretógenos, partículas extrañas, etc. y contienen, si fuera necesario, inhibidores para el crecimiento de microorganismos.

Denominación - Esta Farmacopea denominará los diferentes tipos de inyectables mediante el nombre de la sustancia oficial seguido de:

1. Solución inyectable - Preparaciones líquidas que son sistemas homogéneos.
2. Para inyección - Sólidos que al agregarles vehículos apropiados forman soluciones que cumplen con . todos los requisitos generales aplicables a las soluciones inyectables.
3. Emulsión inyectable - Preparaciones líquidas que son emulsiones de fase externa acuosa u oleosa.
4. Suspensión inyectable - Preparaciones líquidas de sólidos suspendidos en medios líquidos apropiados. No deben emplearse para la administración intravenosa o intratecal.
5. Para suspensión inyectable - Sólidos que mediante el agregado de vehículos apropiados resultan en preparaciones que cumplen con todos los requisitos generales aplicables a las Suspensiones inyectables.

Los envases de las formulaciones inyectables deben llenarse con un volumen ligeramente en exceso del declarado en el rótulo (ver *210. Determinación del contenido extraíble del envase*).

Inyectables de grandes y pequeños volúmenes - En esta Farmacopea, una formulación inyectable de gran volumen corresponde a un inyectable monodosis destinado a la administración intravenosa, envasado en recipientes que contengan un volumen mayor o igual a 100 ml (Solución para infusión). La

designación de formulación inyectable de pequeño volumen se refiere a un inyectable envasado en recipientes que contengan un volumen menor a 100 ml.

Vehículos acuosos - Los vehículos para inyectables deben satisfacer los requisitos de *<340>. Ensayo de piretógenos* o de *<330>. Ensayo de endotoxinas bacterianas*, según se especifique. El *Agua para Inyectables* se emplea generalmente como vehículo, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente. El cloruro de sodio u otro agente isotonizante pueden agregarse en cantidades suficientes para obtener una solución isotónica.

Otros vehículos - Los aceites fijos que se empleen como vehículos no acuosos para inyectables, deberán tener un índice de saponificación ente 185 y 200 (ver *480. Grasas y aceites fijos*) y un índice de iodo entre 79 y 141 (ver *480. Grasas y aceites fijos*).

Los mono o diglicéridos de ácidos grasos pueden emplearse como vehículos con tal que sean líquidos y permanezcan límpidos cuando se enfríen a 10 °C y tengan un *Índice de iodo* no mayor de 140 (ver *480. Grasas y aceites fijos*).

Pueden emplearse éstos u otros vehículos no acuosos, siempre y cuando sean inocuos en la proporción y volumen que se administran y no interfieran con la eficacia terapéutica del preparado.

Sustancias auxiliares - Cuando sea necesario aumentar la estabilidad, pueden agregarse sustancias apropiadas a los preparados inyectables, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, siempre que sean inocuas en las cantidades administradas y no interfieran con la eficacia terapéutica o con los ensayos y valoraciones especificadas. No pueden agregarse sustancias colorantes sólo para dar color a la preparación final de una formulación inyectable (ver *Sustancias auxiliares* en *Consideraciones generales*).

Los inyectables de gran volumen no deben contener conservantes ni colorantes. Tampoco pueden contener estabilizantes a menos que se especifique lo contrario en la monografía correspondiente.

Debe tenerse especial cuidado en la selección y empleo de las sustancias auxiliares que se incorporan en preparados inyectables que se administren en volúmenes mayores de 5 ml y menores o iguales de 100 ml. A menos que se especifique de otro modo, deben considerarse las siguientes recomendaciones: 0,01 % para agentes que contengan mercurio y agentes tensiactivos catiónicos; 0,5 % para clorobutanol, cresol y fenol; 0,2 % para dióxido de azufre o una cantidad equivalente de sulfito, bisulfito, metabisulfito de potasio o de sodio.

JARABES

Ver *Soluciones.*

LOCIONES

Ver *Soluciones, Suspensiones* y *Emulsiones*.

OVULOS

Son formas farmacéuticas sólidas o semirrígidas obtenidas por compresión o colado sobre moldes, para su aplicación en la vagina donde ejercen su acción. Son generalmente globulares u oviformes y pesan aproximadamente 5 g cada uno.

PASTAS

Son formas farmacéuticas semisólidas que contienen un alto porcentaje de sólidos y son destinadas para aplicación tópica. Puede prepararse a partir de un gel acuoso o a partir de excipientes grasos obteniéndose, en estos casos, ungüentos espesos que comúnmente no se ablandan a la temperatura corporal y en consecuencia sirven como capas protectoras sobre las áreas en las cuales se aplican.

PASTILLAS

Son preparados sólidos, destinados a disolverse o desintegrarse lentamente en la boca. Contienen uno o varios principios activos, generalmente en una base azucarada. Pueden ser preparados por moldeo o mediante compresión.

Están generalmente destinadas para el tratamiento de la irritación o las infecciones locales de la boca o la garganta pero pueden contener principios activos destinados a la absorción sistémica después de la ingestión.

PELLETS

Ver *Implantes*.

POLVOS

Son productos sólidos constituidos por una sustancia o mezcla homogénea de sustancias finamente divididos que pueden estar destinadas para uso interno (polvos orales) o externo (polvos tópicos). Debido a su mayor área específica, los polvos se dispersan y se disuelven más fácilmente que las formas farmacéuticas sólidas. Los polvos pueden estar destinados a ser reconstituidos por el farmacéutico o el pariente mediante el agregado de una cantidad específica de agua u otro vehículo al momento de dispensar o usar. Dado que estos productos reconstituidos generalmente tienen una estabilidad limitada, se requiere que se declare el período de vida útil (fecha de vencimiento) a partir de su

reconstitución y pueden requerir conservación en un refrigerador.

POMADAS

Son formas farmacéuticas para uso externo de consistencia semisólida que contienen hasta un 40 % de agua sobre una base grasa.

Cuando la pomada contiene cera en proporción de 25 %, como mínimo, se designa como cerato. Cuando la pomada contiene glicerina en proporción de 50 %, como mínimo, se designa como glicerolado.

PREPARACIONES OFTALMICAS

Los principios activos se administran en los ojos en una amplia variedad de formas farmacéuticas, algunas de las cuales requieren consideraciones especiales. Todas ellas deben ser estériles.

Soluciones oftálmicas - Son soluciones estériles, esencialmente libres de partículas extrañas, apropiadamente preparadas y envasadas para la instilación en el ojo.

Valor de isotonicidad - El líquido lagrimal es isotónico con la sangre, teniendo un valor de isotonicidad que corresponde al de una solución de cloruro de sodio al 0,9 %.

Algunas soluciones oftálmicas son necesariamente hipertónicas para mejorar la absorción o proporcionar suficiente concentración del principio activo para ejercer una acción efectiva. Dado que el volumen empleado de tales soluciones es pequeña, la dilución con el líquido lagrimal tiene lugar rápidamente y el malestar de la hipertonicidad es sólo temporal:

Regulación del pH - Frecuentemente, por razones de compatibilidad, estabilidad o eficacia, el pH de las soluciones oftálmicas es diferente al pH de las lágrimas. Las lágrimas normales tienen un pH de aproximadamente 7,4 y poseen cierta capacidad reguladora. La aplicación de una solución al ojo estimula la secreción lagrimal y la neutralización rápida de cualquier exceso de protones u hidroxilos. Es importante que las soluciones reguladoras de pH que se emplean interfieran lo menos posible con este proceso.

Conservación - Las soluciones oftálmicas pueden envasarse en envases multidosis no mayores a 15 ml cuando se destinen para el uso individual de un paciente y cuando las superficies oculares están intactas. Es obligatorio que los envases primarios para las soluciones oftálmicas estén sellados con un cierre inviolable para que la esterilidad esté asegurada al momento de emplearse por primera vez. Estas soluciones deben contener un conservante para impedir el crecimiento o destruir los microorganismos que se introducen accidentalmente cuando el envase se abre durante el uso.

Cuando se destinen para uso en procedimientos quirúrgicos, las soluciones oftálmicas, aunque deben ser estériles, no deben contener conservantes, ya que pueden ser irritantes a los tejidos oculares.

Suspensiones oftálmicas - Son preparaciones líquidas estériles que contienen partículas sólidas dispersadas en un vehículo líquido destinadas para la aplicación sobre el ojo (ver *Suspensiones*). Es imperativo que tales suspensiones contengan el principio activo en forma micronizada para impedir la irritación y/o la excoriación de la córnea. Las suspensiones oftálmicas no deben presentar aglutinación o agregación.

Ungüentos oftálmicos - Se elaboran con ingredientes esterilizados bajo condiciones asépticas y cumplen con los requisitos de *<370>. Ensayos de esterilidad*.

Los ungüentos oftálmicos deben contener conservantes para impedir el crecimiento de los microorganismos que se introducen accidentalmente cuando el envase se abre durante el uso, a menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, o que la fórmula misma sea bacteriostática. El principio activo se agrega a la base del ungüento como una solución o como un polvo micronizado. El ungüento terminado debe estar exento de partículas grandes y debe cumplir con los requisitos de *<660>. Partículas metálicas en ungüentos oftálmicos*.

SISTEMAS DE LIBERACION

Son productos que permiten la liberación del principio con una velocidad predeterminada durante períodos de tiempo prolongados. Se han desarrollado sistemas de liberación para diferentes vías de administración, algunos de los cuales se describen a continuación.

Sistemas transdérmicos - Son formas farmacéuticas que, cuando se aplican sobre la piel sana, liberan el principio activo en la circulación sistémica a través de la piel. Los sistemas comprenden generalmente una cubierta exterior (barrera), un reservorio para el principio activo, que puede tener una membrana de control de velocidad, un adhesivo de contacto aplicado a alguna o todas las partes del sistema, la interfase sistema/piel y un envoltorio protector que se quita antes de aplicar el sistema.

La actividad de estos sistemas se define en función de la velocidad de liberación del principio activo del mismo. También puede declararse la duración total de la liberación del principio activo del sistema y su área superficial.

Los sistemas transdérmicos de liberación de principios activos funcionan mediante difusión: difunde desde el reservorio, directamente o a través de la membrana controladora de velocidad y/o el adhesivo de contacto si está presente y luego a través de la piel a la circulación general. Los sistemas de liberación modificada están diseñados para liberar el principio activo a una velocidad constante, para lograr una concentración sanguínea constante y apropiada que se mantenga hasta que el sistema sea retirado. En ese momento, la concentración sanguínea desciende a velocidad compatible con la farmacocinética del principio activo.

Sistema ocular - Está destinado para ser localizado en el fondo del saco conjuntival inferior del cual el principio activo difunde a través de una membrana a una velocidad constante.

Sistema intrauterino - Son sistemas basados en un principio similar a los descriptos anteriormente pero diseñados para que la liberación del principio activo ocurra durante un período de tiempo más largo, por ej., 1 año.

Apósitos - Son materiales de distinta naturaleza que se aplican sobre piel o mucosa, sana o lesionada, con el objetivo de aislar, proteger, absorber y/o promover la curación de una lesión.

SOLUCIONES

Son preparados líquidos que contienen una o varias sustancias disueltas en un solvente o una mezcla apropiada de solventes miscibles entre sí. Ya que las moléculas en las soluciones se dispersan uniformemente, el empleo de soluciones como forma farmacéutica contempla en general la seguridad de dosificación uniforme con la administración y buena exactitud cuando se diluyen o se mezclan con otras soluciones.

Las formas farmacéuticas categorizadas como Soluciones se clasifican según la vía de administración, en *Soluciones orales* y *Soluciones tópicas* o por la naturaleza de las sustancias disueltas y los solventes, empleados, en *Tinturas*, *Aguas aromáticas*, *Alcoholados*, *Oleolados*, etc. Las soluciones destinadas para la administración parenteral son denominadas oficialmente *Soluciones inyectables*.

Soluciones orales - Las soluciones orales son preparados líquidos, destinados para la administración oral, que contienen uno o varios principios activos con o sin aromatizantes, endulzantes, o colorantes disueltos en agua o en mezclas de agua y cosolventes. Las soluciones orales pueden formularse para la administración oral directa al paciente o pueden dispensarse en una forma más concentrada que debe diluirse antes de la administración. Es importante reconocer que la dilución con agua de las soluciones orales que contienen cosolventes como alcohol, podría conducir a la precipitación de algunos componentes. Las preparados dispensados como sólidos solubles o mezclas solubles de sólidos, con la intención de disolverlos en un solvente y administrarlos oralmente, se denominan *para solución oral*.

Las soluciones orales que contienen concentraciones altas de sacarosa u otros azúcares tradicionalmente se han denominado como *Jarabes*. Una solución de sacarosa en agua cercana al punto de saturación, se denomina *Jarabe* o *Jarabe simple*. Bajo la denominación de *Jarabe*, también se incluyen otras formas farmacéuticas líquidas preparadas en un vehículo dulce y viscoso, incluyendo suspensiones orales.

Además de la sacarosa y otros azúcares, ciertos polialcoholes como el sorbitol o la glicerina puede estar presente en las soluciones orales para inhibir la cristalización y modificar la solubilidad, el gusto, la palatabilidad y otras propiedades del vehículo. Generalmente contienen conservantes para impedir el crecimiento de bacterias, levaduras y mohos. Algunas soluciones orales sin azúcar contienen agentes endulzantes como sorbitol o edulcorantes sintéticos, así como agentes viscosantes.

Tales soluciones dulces viscosas, sin azúcares, son ocasionalmente preparadas como vehículos para la administración de los principios activos a los pacientes diabéticos.

Las Soluciones orales, que contienen alcohol como cosolvente, se han denominado tradicionalmente *Elixires*. Dado que las concentraciones altas de alcohol pueden producir un efecto farmacológico cuando son administradas oralmente, se emplean otros cosolventes, como glicerina y propilenglicol, para reducir al mínimo la cantidad de alcohol requerida.

Soluciones oftálmicas - Ver *Preparaciones oftálmicas*.

Soluciones tópicas - Son soluciones generalmente acuosas, que a menudo contienen otros solventes como alcohol y polialcoholes. Están destinadas para la aplicación tópica sobre la piel o sobre la superficie de las mucosas. El término *Loción* se aplica a soluciones, suspensiones o emulsiones aplicadas tópicamente.

Soluciones óticas - Destinadas para la instilación en el oído externo, son soluciones acuosas o soluciones que contienen glicerina u otros solventes y agentes de dispersión.

Solución nasal - Son soluciones acuosas de sustancias medicamentosas destinadas a ser introduci-

das en las fosas nasales en forma de gotas o pulverizaciones.

Solución para nebulizar - Son soluciones medicamentosas destinadas a llevar la medicación hasta las partes más profundas del tracto respiratorio. Se logra colocándando la solución en un nebulizador donde se produce atomización del liquido en partículas finas y uniformes suspendidas en un gas (aire u oxigeno).

Tinturas - Son soluciones alcohólicas o hidroalcohólicas preparadas a partir de drogas vegetales u otro origen. Las drogas heroicas o muy activas se prepararán en general, de manera que por cada 100 g de droga se obtengan 1.000 ml de tintura. La concentración se ajustará después de la valoración. Las tinturas de drogas no heroicas o poco activas se prepararán de manera tal que por cada 200 g de droga se obtengan 1.000 ml de tintura.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, para la preparación de las tinturas oficiales se emplearán los siguientes métodos:

Procedimiento L (Lixiviación) - Mezclar extensivamente la droga molida con una cantidad suficiente de menstruo que permita una impregnación uniforme. Dejar en reposo durante 15 minutos, transferir a un percolador apropiado y empacar firmemente. Verter una cantidad suficiente de disolvente de manera que la droga, en su totalidad, quede cubierta por el mismo. Dejar macerando durante 24 horas o por el tiempo especificado en la monografía correspondiente, con el percolador tapado. Si no se indica ninguna valoración, dejar que la percolación proceda lentamente, o a la velocidad especificada en la monografía, agregando gradualmente el menstruo en cantidad suficiente para producir 1.000 ml de tintura y mezclar. Si es necesaria una valoración, recolectar los primeros 950 ml del percolado, mezclar y analizar una alicuota según se indique. Diluir el resto con tal cantidad de disolvente utilizado, hasta obtener una tintura que se ajuste a la norma y mezclar.

Procedimiento M (Maceración) – Mezclar la droga molida con 750 ml del menstruo a utilizar, en un recipiente cerrado y colocarlo a temperatura ambiente, agitando con frecuencia durante 3 días a menos que se especifique otra cosa en la monografía. Filtrar, prensar el residuo, lavar el recipiente y el residuo con pequeñas porciones del menstruo utilizado, combinando los filtrados para producir 1.000 ml de tintura y mezclar.

El rótulo deberá indicar: la nomenclatura, la proporción del material de partida en relación a la cantidad de tintura final y el contenido porcentual de etanol en v/v en la tintura final.

Infusión - Es una forma farmacéutica líquida, recientemente preparada, obtenida por la acción del agua caliente durante 20 minutos, sobre drogas vegetales poco activas, convenientemente divididas (molidas).

Transferir la droga a un recipiente apropiado de cierre perfecto, agregar agua destilada hirviendo en cantidad aproximadamente igual a la del preparado que se ha de obtener y tapar el recipiente. Luego de 20 minutos, colar o filtrar con expresión, según el caso, y lavar el residuo con cantidad suficiente de agua para completar el volumen requerido.

Si no se especifica de otro modo, las infusiones se preparan al 5 % p/v. Salvo indicación especial, todas las infusiones deben prepararse únicamente con las drogas correspondientes y no con extractos u otros productos.

Cocimiento o decocción - Es una forma farmacéutica líquida, recientemente preparada, obtenida por la acción del agua mantenida a ebullición durante 20 minutos, sobre drogas vegetales poco activas, convenientemente fragmentadas o molidas.

Colocar la droga en un recipiente adecuado, verter agua destilada en cantidad aproximadamente igual a la del preparado que se ha de obtener y tapar el recipiente imperfectamente. Calentar la mezcla hasta que el agua hierva y mantener durante 20 minutos a ebullición lenta. Enfriar, colar o filtrar con expresión, según el caso, y lavar el residuo con cantidad suficiente de agua para completar el volumen requerido.

Si no se especifica de otro modo, las decocciones se preparan al 5 % p/v. Salvo indicación especial, todos los cocimientos deben prepararse únicamente con las drogas correspondientes y no con extractos u otros productos.

SUPOSITORIOS

Son cuerpos sólidos de diversos tamaños y formas, adaptados para la introducción en el recto. Se deben ablandar o disolver a la temperatura corporal (ver *400. Ensayos farmacotécnicos para supositorios*). Un supositorio puede actuar como un protector o paliativo local o como un vehículo de principios activos para producir una acción sistémica o local. Las bases de supositorio generalmente empleadas son manteca de cacao, gelatina glicerinada, aceites vegetales hidrogenados, mezclas de polietilenglicoles de diversos pesos moleculares y ésteres de ácidos grasos del polietilenglicol.

La base de supositorio tiene una influencia marcada en la liberación del principio activo.

Supositorios de manteca de cacao - Estos supositorios pueden elaborarse incorporando el principio activo finamente dividido en la base a tempe-

ratura ambiente y luego moldear apropiadamente la masa resultante o bien fundiendo la base para permitir que la suspensión resultante solidifique por enfriamiento en los moldes. Puede agregarse una cantidad apropiada de agentes de endurecimiento para contrarrestar la tendencia a ablandarse de los productos que contienen algunos principios activos, como por ej., el hidrato de cloral.

Los supositorios para adultos se estrechan en uno o ambos extremos y pesan aproximadamente 2 g cada uno. Los supositorios preparados con otras bases varían en el peso y son en general más pesados.

Los supositorios con manteca de cacao como base requieren conservación en envases bien cerrados, a una temperatura menor de 30 °C (temperatura ambiente controlada).

Sustitutos de la manteca de cacao - Las bases para supositorios de tipo graso pueden obtenerse a partir de una variedad de aceites vegetales, como el de coco o de palma, que son modificados mediante esterificación, hidrogenación y fraccionamiento para obtener productos de composición y temperatura de fusión variables. Estas bases permiten lograr las características deseadas como intervalos estrechos entre la temperatura de fusión y de solidificación e intervalos de fusión que se adecuen a diversas condiciones climáticas y de la formulación.

Supositorios de gelatina glicerinada - Los principios activos pueden incorporarse en bases de gelatina glicerinada mediante el agregado de las cantidades indicadas a un vehículo que consiste en glicerina, gelatina y agua (70:20:10).

Los supositorios de gelatina glicerinada requieren conservación en envases de cierre perfecto, a una temperatura menor de 35 °C.

Supositorios de polietilenglicol - Varias combinaciones de polietilenglicol con temperaturas de fusión mayor que la temperatura corporal se emplean como bases de supositorios. Dado que la liberación a partir de estas bases depende de la disolución en lugar de la fusión, existen significativamente menos problemas en la preparación y conservación que los que existen con vehículos que actúan por fusión. Sin embargo, altas concentraciones de polietilenglicoles de peso molecular mayor pueden extender el tiempo de disolución, dando lugar a problemas de retención. Los rótulos en los supositorios de polietilenglicol, deben contener instrucciones que indiquen que se deben humedecer con agua antes de usar. Aunque pueden almacenarse sin refrigeración, deben mantenerse en envases herméticamente cerrados.

Bases de supositorio con agentes tensioactivos - Varios agentes tensioactivos no iónicos relacionados químicamente con los polietilenglicoles se emplean cómo vehículos de supositorios. Estos agentes tensioactivos se emplean solos o en combinación con otros vehículos para producir la consistencia y temperaturas de fusión apropiadas. Una de las ventajas principales de tales vehículos es que se dispersan con facilidad en contacto con el agua. Sin embargo, debe tenerse cuidado con el empleo de agentes tensioactivos, porque puede aumentar la velocidad de absorción del principio activo, o interactuar con moléculas del principio activo, causando una disminución en la actividad terapéutica.

SUSPENSIONES

Son preparados líquidos constituidos por partículas sólidas dispersadas en una fase líquida en la cual las partículas no son solubles. Estos productos se diseñan para administrarse por diferentes vías como *Suspensiones orales*, *Suspensiones inyectables*, *Suspensiones tópicas*; etc. Algunas suspensiones están preparadas y listas para su uso, mientras que otras se presentan como mezclas de polvos para reconstituirse antes de su uso, con el vehículo que corresponda. Tales productos se denominan *para suspensión oral*, etc. El término *Leche* a veces se emplea para las suspensiones en vehículos acuosos destinadas para la administración oral. El término *Magma*, a menudo se emplea para describir las suspensiones de sólidos inorgánicos hidrofilicos como las arcillas, que originan sistemas con un comportamiento reológico similar a los geles. El término *Loción* se emplea para categorizar muchas suspensiones y emulsiones tópicas destinadas para la aplicación sobre la piel. Algunas suspensiones son preparadas en forma estéril y se emplean como inyectables o para la administración oftálmica.

Por su misma naturaleza, los sólidos en una suspensión puede sedimentar en el fondo del envase. Tal sedimentación también puede conducir a la aglutinación y la solidificación del sedimento con la resultante dificultad para la redispersión de la suspensión por agitación. Para impedir tales problemas, se emplean una variedad de sustancias auxiliares tales como agentes tensioactivos, agentes viscosantes de diferentes tipos (polímeros hidrofílicos, arcillas), agentes floculantes, modificadores de la densidad, etc. Es importante que las suspensiones siempre se agiten antes de ser empleadas para asegurar la distribución uniforme del sólido en el vehículo y de ese modo asegurar la dosificación uniforme y apropiada. Las suspensiones requieren conservación en envases de cierre perfecto.

Suspensiones orales - Son preparados líquidos que contienen partículas sólidas dispersadas en un vehículo líquido, con agentes saborizantes apropiados, destinados para la administración oral. Algunas suspensiones rotuladas como *Leches* o *Magmas* pertenecen a esta categoría.

Suspensiones tópicas - Son preparaciones líquidas que contienen partículas sólidas dispersas en un vehículo líquido, destinadas para la aplicación sobre la piel. Algunas suspensiones rotuladas como *Lociones* pertenecen a esta categoría.

Suspensiones óticas - Son preparaciones líquidas que contienen partículas micronizadas destinadas para la instilación en el oído externo.

Suspensiones oftálmicas - Ver *Preparaciones oftálmicas.*

Suspensiones inyectables - Ver *Inyectables*.

Suspensión rectal - Son sistemas bifásicos de partículas sólidas mayor a 0,1 μm dispersas en un vehículo líquido de aplicación rectal. Enemas suspensión.

TISANAS

Consiste en una o más drogas vegetales enteras, fragmentadas o molidas, destinadas a preparaciones acuosas por medio de decocción, infusión o maceración. La preparación se realiza inmediatamente antes de sus uso.

Las tisanas generalmente se suministran a granel o en bolsitas. Conservar en envases inactínicos, bien cerrados.

Las tisanas deberán cumplir con los requerimientos indicados en *<630> Métodos de Farmacognosia.* Las tisanas suministradas en bolsitas deberán satisfacer el siguiente ensayo:

Uniformidad de masa: determinar el peso de veinte unidades elegidas al azar, según se indica a continuación. Pesar una bolsita llena de tisana vegetal, abrirla cuidadosamente, vaciarla completamente utilizando pincel. Pesar la bolsita vacía y calcular el contenido por diferencia de peso. A menos que se indique lo contrario, no más de dos de las veinte masas individuales de los contenidos se deben desviar de la masa media por encima del porcentaje de desviación indicado en la siguiente tabla y en ningún caso la desviación puede ser mayor de dos veces dicho porcentaje.

Masa media (g)	*% de desviación*
menor a 1,5	15
entre 1,5 y 2,0	10
mayor de 2,0	7,5

UNGÜENTOS

Son preparaciones semisólidas destinadas para la aplicación externa sobre la piel o mucosas y que emplean como vehículo grasas y/o resinas.

Existen diversos tipos de bases para ungüentos. La elección de la base depende de muchos factores, como la acción deseada, la naturaleza del principio activo a incorporar, su biodisponibilidad, la estabilidad y el período máximo de vida útil requerido para el producto terminado. Los principios activos que se hidrolizan rápidamente, son más estables en bases constituidas por hidrocarburos que en bases que contengan agua, aunque pueden ser más efectivas en estas últimas.

1055. FORMULACIONES HOSPITALARIAS PARA CUIDADOS PALIATIVOS

Introducción

Los Cuidados Paliativos surgen en la década del 50 como una respuesta científica y humanista para los enfermos adultos con cáncer avanzado y terminal.

El cambio del objetivo terapéutico de curar por el objetivo de brindar alivio tanto del dolor como de cualquier otro síntoma que tuviera el paciente y el compromiso de acompañamiento para él y su familia durante el transcurso de su enfermedad son los pilares básicos de la Medicina Paliativa. A éstos debemos agregar el Cuidado de los que asisten al enfermo. Éste constituye el tercer pilar en el cual se establecen las estrategias que permiten al equipo de salud que asiste a estos enfermos y familias no agotarse en el trabajo.

Dar jerarquía e importancia a los síntomas y su alivio frente a una enfermedad que no tiene posibilidades de curación es el mayor aporte que esta nueva especialidad ha dado a la medicina a finales del siglo pasado.

El modelo se extendió hacia la asistencia a otras enfermedades y grupos de pacientes. Enfermedades crónicas evolutivas: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, enfermedades neurológicas invalidantes, cardiopatías, enfermos con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (HIV), etc.

En Pediatría desde su comienzo a fines de la década del 70 se aplicaron no sólo para niños con enfermedad terminal sino también para niños con enfermedades crónicas amenazantes para la vida (enfermedades genéticas, neurológicas evolutivas, Cardiopatías, Fibrosis Quística Pulmonar, etc.). Sus bases filosóficas y metodológicas son iguales: alivio de síntomas, acompañamiento del niño y su familia y cuidado del equipo asistencial.

Los Cuidados Paliativos por lo tanto, se ocupan de la asistencia de personas con enfermedad en etapa incurable y terminal, a fin de garantizar la máxima calidad de vida posible al enfermo y a su grupo familiar.

La Organización Mundial de la Salud define a los Cuidados Paliativos como la *"asistencia integral, individualizada y continuada de las personas enfermas en situación avanzada y terminal, teniendo en el enfermo y su familia la unidad a tratar, desde un punto de vista activo, vivo y rehabilitador con objetivos de confort"*.

Los Cuidados Paliativos son brindados por equipos interdisciplinarios de salud, que deben garantizar:

1. *Control de síntomas*: el dolor y un conjunto de síntomas discapacitantes aparecen con marcada frecuencia en estos enfermos: su alivio apropiado es una de las funciones principales del programa, mejorando los síntomas y el nivel de actividad.

2. *Acompañamiento*: se trata de la táctica de cuidados psicológicos y espirituales que, con absoluto respeto a la personalidad y las creencias de los pacientes y sus familiares, facilita el nivel de adaptación a la situación presente y ayuda a prever complicaciones evitables (ej.: claudicación de la familia, trastornos en los niños, duelo patológico, imposibilidad de hallar un sentido personalizado a la dolencia).

3. *Cuidado del equipo asistencial*, tercer pilar de la medicina paliativa estableciendo estrategias que permitan al equipo de salud que asiste a estos enfermos y familias no agotarse por el trabajo.

DOLOR

"El dolor es una desagradable experiencia sensorial y emocional que se asocia a un daño real o potencial de los tejidos o que se describe en términos de dicho daño". (Asociación Internacional para el Estudio del Dolor)

El dolor es siempre subjetivo. Cada individuo aprende a aplicar este término a través de experiencias traumáticas en los primeros años de vida. Indudablemente se trata de una sensación en una o más partes del cuerpo, pero también es siempre desagradable y por lo tanto supone una experiencia emocional.

Generalmente se asocia el dolor a la llegada de un estímulo nociceptivo al Sistema Nervioso Central. Sin embargo existen ocasiones en las que el cerebro puede generar dolor en ausencia de esta aferencia. Esto es debido a la existencia en el cerebro de una representación de la imagen corporal denominada neuromatriz.

Es fácil de comprender entonces que la percepción del dolor puede ser modificada de varias maneras, ya sea modificando las aferencias (analgésicos, kinesioterapia) o las diversas

influencias corticales (psicoterapia, técnicas cognitivo conductuales) que recibe la neuromatriz.

Componentes del dolor

Se pueden distinguir cuatro componentes del síntoma:

Nocicepción: es la detección del daño tisular por parte de transductores especializados ubicados en las fibras Aδ y C (nociceptores). Estos transductores son activados cuando hay cambios neurales e inflamatorios en el entorno.

Percepción del dolor: es desencadenada por un estímulo nociceptivo (lesión o enfermedad) o por lesiones del sistema nervioso central.

Sufrimiento: es una respuesta negativa al dolor pero también al temor, ansiedad, estrés, pérdidas, etc. Aparece cuando la integridad física se encuentra amenazada. Frecuentemente se lo equipara de manera errónea al dolor.

Conducta frente al dolor: son las acciones que una persona hace o deja de hacer y que pueden ser atribuidas a la presencia de daño tisular (llorar, gritar, consultar al médico). Son conductas reales, observables y cuantificables por otros. Es el único componente que podemos evaluar.

Partiendo de las conductas observadas y apoyándonos en la historia clínica y el examen físico inferimos la existencia de nocicepción, dolor y sufrimiento.

Tipos de dolor

Agudo: es producido por la activación de nociceptores secundaria a daño tisular. El dolor termina con la cicatrización, a veces bastante tiempo después. El tratamiento está orientado a resolver la patología de base y a aliviar el síntoma. Dado que la cicatrización demora días o semanas, el dolor que persiste meses o años no se clasifica como agudo.

Una salvedad es el dolor por cáncer en la que la invasión a los tejidos es persistente por lo que se comporta como un dolor agudo continuo.

Crónico: puede ser originado por la injuria pero es perpetuado por otros factores. No hay curación. La injuria puede exceder la capacidad de cicatrización ya sea por pérdida de la región (amputación), lesiones extensas con pérdida de sustancia y cicatrización dificultosa o lesión del sistema nervioso (sección medular, neuritis)

Puede haber dolor crónico en ausencia de injuria.

El tratamiento provee alivio transitorio (no resuelve la patología de base). La terapia psicológica puede disminuir el impacto del dolor sobre la vida cotidiana.

Causas:

1. Por la enfermedad neoplásica subyacente: en partes blandas (metástasis dérmicas), visceral (obstrucción intestinal tumoral), óseo (metástasis o t umor primario), neuropático (infiltración de nervio),.
2. Debido a la terapéutica: ej.: mucositis post-quimioterapia, neuritis actínica,
3. Por la debilidad asociada al cáncer: ej.: dolor por constipación, espasmo muscular,
4. Por patología concurrente: ej.: osteoartrosis, espondilosis,

Manejo terapéutico:

1. Tratamiento de la causa.
2. Medidas no farmacológicas: físicas, kinesiológicas, psicológicas, etc
3. Tratamiento farmacológico del dolor: es la piedra angular del alivio del síntoma

Protocolo Terapéutico Farmacológico:

Considerar:

1. Tipo del dolor según mecanismos
2. Intensidad del dolor
3. Tratamiento analgésico previo
4. Criterio de "analgesia de amplio espectro"
5. Principios para el uso de analgésicos

Tratamiento farmacológico:

La OMS propone una escalera para el tratamiento farmacológico adecuado:

1. No opioide con o sin adyuvante.
2. Opioide "débil" más no opioide con o sin adyuvante.
3. Opioide "fuerte" más no opioide con o sin adyuvante.

Tratamiento analgésico:

El equipo de Cuidados Paliativos debe analizar la respuesta a los fármacos que recibe el paciente previo a la consulta actual. Debe optimizar posología (dosis, intervalo/dosis), agregar fármacos necesarios (ej.: adyuvantes) o modificar los fármacos prescritos.

a) analgésicos no opioides (paracetamol, antinflamatorios no esteroides (AINEs)

b) analgésicos opioides (débiles y fuertes, según vademécum)

c) adyuvantes (ej.: antidepresivos, anticonvulsivantes, corticosteroides; laxantes, antieméticos, psicoestimulantes)

Los *fármacos adyuvantes* cumplen dos objetivos: o bien se indican para favorecer el alivio de determinados dolores que responden parcialmente a l os analgésicos (ejemplo: carbamacepina en dolor neuropático) o bien se prescriben para controlar efectos adversos de los analgésicos, favoreciendo que los mismos pueden ser administrados con menor riesgo y toxicidad. (Ej.: indicación de laxante para prevenir o controlar la constipación inducida por opioides).

Cuando se decida sustituir un opioide por otro ("rotación de opioides"), por considerar a un dolor como "resistente" a un determinado opioide, hay que tener en cuenta las recomendaciones internacionales sobre dosis a utilizar, especialmente si el opioide que se indica es metadona.

LISTADO DE FARMACOS PARA EL CONTROL DEL DOLOR POR CANCER

1. Analgésicos Primarios

1.1. Analgésicos No Opioides

1.1.1 Primera Opción: Paracetamol, Ibuprofeno

1.1.2. Segunda Opción: Naproxeno

1.2. Analgésicos Opioides

1.2.1. Primera Opción

1.2.1.1. Débiles: Codeína, Propoxifeno, Tramadol

1.2.1.2. Fuertes: Morfina, Oxicodona

1.2.2. Segunda Opción: Metadona

2. **Analgésicos Secundarios (control de dolor de mecanismo neuropático)**

2.1. Primera Opción: Dexametasona, Carbamacepina, Valproato, Amitriptilina, Desipramina

2.2. Segunda Opción: Clonazepam, Gabapentina, Ketamina

3. Otros Adyuvantes (control de síntomas asociados al dolor)

3.1. Primera Opción: Baclofeno, Butilbromuro de Hioscina, Diazepam, Haloperidol

3.2. Segunda Opción: Midazolam, Levomepromazina

Una de las formas mas comunes para tratar pacientes con enfermedades crónicas, en las que se presenta el dolor como un integrante infaltable al momento del control de síntomas, es el uso de opiáceos en forma de solución oral, preparado magistral que puede prepararse en la oficina de farmacia o en el laboratorio farmacéutico del hospital.

Como este no es el único motivo, existe un interés sanitario por la formulación magistral, que deriva sobre todo de los siguientes supuestos de preparación:

1. Formas farmacéuticas distintas a l as comercializadas, para facilitar su administración a determinados pacientes

2. Formulaciones con excipientes que mejoran la eficacia y/o tolerancia respecto a l a especialidad farmacéutica.

3. Formulaciones con fármacos que ya no se encuentran en el mercado farmacéutico

4. Formas farmacéuticas con dosis o concentraciones que no existen en el mercado.

Todas estas son conocidas como *Formulaciones Huérfanas*, que deben preparase en el laboratorio de farmacia del hospital o en la oficina de farmacia (ver *1027. Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos Magistrales*) tarea de gran responsabilidad, donde la calidad del producto terminado debe ser adecuada para la dosificación por parte del paciente y deberá asegurarse la estabilidad de la misma por un tiempo prudencial, como asimismo asegurar que la cantidad de principio activo por unidad de volumen no varíe en el tiempo ya que esto impedirá un buen control del síntoma por parte de los pacientes, y de los médicos en cuanto a cual será la dosis que realmente alivia el dolor.

FORMULACIONES

MORFINA 2 %
SOLUCIÓN ORAL

Morfina Clorhidrato.....2,00 g
Metilparabeno.....0,10 g
Sorbitol 70%.....…..……....25,0 ml
Agua Destilada c.s.p.....…..…..100,0 ml

Preparación - Disolver el metilparabeno en 40 ml de agua destilada previamente calentada aproximadamente a 90 °C. Enfriar la solución, agregar el clorhidrato de morfina y a gitar hasta disolución. Agregar el sorbitol, filtrar y diluir a 100,0 ml con agua destilada, pasando por el filtro suficiente cantidad de la misma.

[NOTA: como la morfina clorhidrato es soluble hasta un 4 %, ésta es la concentración máxima a la cual se pueden preparar las soluciones.]

METADONA

Metadona .....1,0 g
Benzoato de Sodio.....0,1 g
Sacarina Sódica.....……...…..0,2 g
Sorbitol 70%.....…….45 ml
Esencia de Frutilla.....0,10 g
Sorbitol 70%.....……...…..25,0 ml
Agua Destilada c.s.p.....……..100,0 ml

Preparación - Disolver el benzoato de sodio en 40 ml de agua destilada previamente calentada aproximadamente a 90 °C. Enfriar, agregar la sacarina sódica y disolver. Agregar la metadona y agitar hasta disolución, calentar si fuera necesario. Agregar la esencia de glicerina y el sorbitol, filtrar y lavar el filtro con el agua destilada hasta 100,0 ml.

CODEÍNA 3 %
SOLUCIÓN ORAL

Codeína, Clorhidrato .....0,30 g
Metilparabeno.....0,10 g
Sorbitol 70%.....……...…..25,0 ml
Agua Destilada c.s.p.....……..100,0 ml

Preparación - Disolver el metilparabeno en 40 ml de agua destilada previamente calentada aproximadamente a 90 °C. Enfriar, agregar el clorhidrato de codeína y agitar hasta disolución. Agregar el sorbitol, filtrar y lavar el filtro con el agua destilada hasta 100,0 ml.

CLORPROMAZINA E HIDROCORTISONA
CREMA

Clorpromazina…….....0,20 g
Acetato de Hidrocortisona.....0,25 g
Cera Lanette sx…….....…….....10,00 g
Vaselina Líquida...……..…….....4,0 ml
Metilparabeno…….....0,10 g
Propilenglicol….....12,0 ml
Agua Destilada c.s.p.....……..…….75,0 ml

Preparación

Base hidrosoluble - Disolver el metilparabeno en 75 ml de agua destilada, previamente calentada aproximadamente a 90 °C. Agregar 6,0 ml de propilenglicol y mezclar. Fundir la cera lanette sx y agregar la vaselina líquida agitando hasta homogeneizar. Calentar las fases oleosa y acuosa aproximadamente a 70 °C, agregar la fase acuosa sobre la oleosa agitando en forma continua hasta que la emulsión se enfríe.

Crema - Transferir el acetato de hidrocortisona y la clorpromazina a un mortero y agregar lentamente 6,0 ml de propilenglicol triturando hasta formar una mezcla homogénea. A gregar la *Base hidrosoluble* realizando diluciones geométricas, triturando y contundiendo, hasta homogeneizar. Llevar a peso final con la *Base hidrosoluble*.

CLORHEXIDINA 0,12 %
SOLUCIÓN

Clorhexidina Gluconato, Solución 20%.....0,60 ml
Glicerina.....5,0 ml
Esencia de Menta…….....….0,03 ml
Agua Destilada c.s.p.....100,0 ml

Preparación - Diluir la esencia de menta en la glicerina. Agregar esta solución, en etapas sucesivas y agitando hasta homogeneizar, a un recipiente apropiado conteniendo la solución de gluconato de clorhexidina 20 % y 4 0 ml de agua. Completar a 100,0 ml con agua destilada y filtrar.

SIMETICONA SUSPENSIÓN

Simeticona Líquida.....15,0 ml
Hidróxido de Aluminio.....1,5 g
Carboximetilcelulosa..…….....….0,8 g
Tween 20.....……..0,1 ml
Glicerina.....……...5,0 ml
Sorbitol 70% .....…….…..20,0 ml
Esencia de Frambuesa.....……..0,1 ml
Metilparabeno..……....0,1 g
Rojo Punzó.....…….…….0,5 mg
Sacarina Sódica.....……..0,2 g
Agua Destilada c.s.p...……100,0 ml

Preparación - Disolver el metilparabeno en 60 ml de agua destilada previamente calentada aproximadamente a 90 °C. A gregar la sacarina y agitar hasta disolución. Agregar el tween 20 y el rojo punzó y agitar hasta homogeneizar. Suspender el hidróxido de aluminio, agitando hasta obtener

una suspensión uniforme. Colocar la carboximetilcelulosa en un mortero y agregar en etapas sucesivas la glicerina, triturando y contundiendo, hasta formar un ge l homogéneo. Disolver la esencia de frambuesa en 20,0 ml de sorbitol y agregar esta solución al gel de carboximetilcelulosa del paso anterior, agitando hasta homogeneizar. A gregar la suspensión preparada inicialmente al gel en etapas sucesivas y agitando hasta homogeneizar. A gregar la simeticona en etapas, y agitar en forma continua hasta homogeneizar. Llevar a l 00,0 ml con agua destilada y agitar hasta lograr una preparación homogénea.

GEL PARA MUCOSITIS (OROGEL)

Vitamina A, Palmitato de (1.000.000 UI/ml)……..……..0,125 ml
Nistatina..…….....0,5 g
Vitamina E….....……....1 g
Lidocaína, Clorhidrato.de …….....2 g
Hidrocortisona.……...……1 g
Sacarina Sódica.....….…....0,5 g
Metilparabeno..……...0,08 g
Propilparabeno.....……...…0,02 g
Carbopol.....…….....2,5 g
Tween 20..……....0,2 g
Esencia de Limón……....0,1 ml
Sorbitol 70 %.....……..…..….20 ml
Trietanolamina.....……..…..2 ml
Agua Destilada c.s.p...……...……..100,0 ml

Preparación - Disolver el metilparabeno y el propilparabeno en 40 ml de agua destilada previamente calentada aproximadamente a 90 °C. Agregar la sacarina sódica y agitar hasta disolución. Agregar el clorhidrato de lidocaína y agitar hasta disolución. Dejar enfriar. Agregar el carbopol y agitar hasta obtener una suspensión uniforme.

Tamizar la nistatina y transferir a un mortero con la hidrocortisona, y triturar con la mezcla de vitamina A, vitamina E y tween 20 agregada a 20 ml de agua destilada. Homogeneizar. Agregar a la suspensión inicialmente preparada y agitar hasta homogeneizar. Agregar una solución preparada a partir de esencia de limón en sorbitol previamente homogeneizada y llevar a 100,0 ml con agua destilada. Agregar la trietanolamina y agitar hasta que se forme el gel.

1060. FRIABILIDAD Y DUREZA DE COMPRIMIDOS

Friabilidad de comprimidos

Este ensayo se emplea para determinar que los comprimidos no recubiertos, cuando se someten a estrés mecánico, no se dañen y/o muestren evidencias de laminación o ruptura.

Aparato - Emplear un tambor transparente con un diámetro interno de 286 mm y una profundidad aproximada de 39 mm, con superficies internas pulidas (ver *Figura*). Una de las caras del tambor permite introducir los comprimidos a ensayar. El tambor se fija, a través de su eje horizontal, a un dispositivo que le imprime un movimiento rotatorio de aproximadamente 25 rpm. De este modo, en cada vuelta de tambor, los comprimidos ruedan o se deslizan y caen desde una altura de aproximadamente 130 mm.

Procedimiento - Para comprimidos que pesen hasta 0,65 g cada uno, tornar una muestra equivalente a 6,5 g; para comprimidos que pesen más de 0,65 g, tomar una muestra de diez unidades y eliminar las partículas de polvo con la ayuda de aire o un cepillo blando. Pesar la muestra de comprimidos con exactitud y colocarla en el tambor. Rotar el tambor 100 veces y retirar los comprimidos. Eliminar las partículas de polvo con la ayuda de aire o un cepillo blando. Si no se observan comprimidos rotos, pesarlos exactamente.

Interpretación de los resultados - Generalmente el ensayo se realiza una sola vez. Si la pérdida de peso es mayor a 1 %, repetir el ensayo dos veces y calcular el promedio de las tres determinaciones. Se considera aceptable una pérdida de peso máxima de 1 %.

Para comprimidos efervescentes y masticables, pueden aceptarse especificaciones diferentes de friabilidad, ya que los mismos requieren condiciones especiales de envasado para evitar que se dañen.

Dureza de comprimidos

Este ensayo se emplea para determinar la dureza de los comprimidos medida por la fuerza necesaria para producir la ruptura de los mismos.

Aparato - El aparato consta de dos brazos enfrentados uno con otro, uno de los cuales se mueve en dirección al otro. Las superficies de los brazos, donde se produce la ruptura, son planas, perpendiculares a la dirección del movimiento y mayores que la superficie de contacto del comprimido. El aparato se calibra con la ayuda de un sistema cuya precisión es de 1 Newton.

Procedimiento - Colocar el comprimido entre los dos brazos y aumentar la presión hasta que se produzca la ruptura. Realizar la medición sobre diez comprimidos, teniendo la precaución de eliminar todos los fragmentos del comprimido antes de cada determinación. Orientar los comprimidos siempre en la misma dirección con respecto a la aplicación de la fuerza.

Expresar el resultado como el valor promedio, el máximo y el mínimo de las fuerzas medidas expresadas en newtons. Indicar el tipo de aparato y, cuando corresponda, la orientación del comprimido.

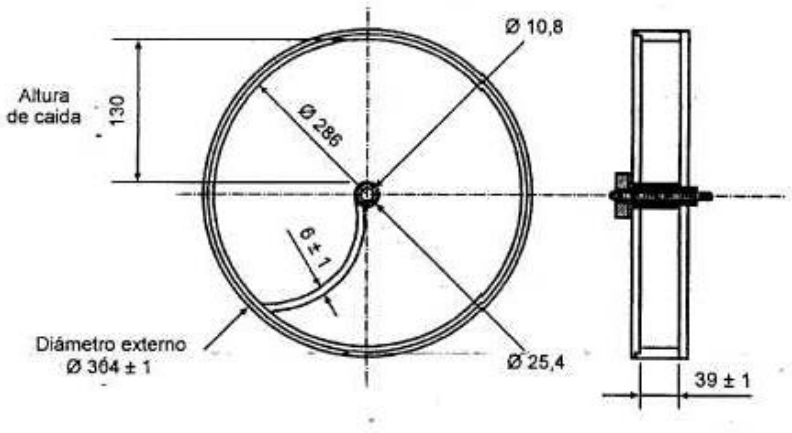


Figura. Aparato para la determinación de la friabilidad de comprimidos.

1070. IMPUREZAS EN PRODUCTOS OFICIALES

El concepto de pureza cambia con el tiempo junto con los avances de la química analítica. Si de un material que previamente se consideraba puro, pueden separarse más de un componente, deben redefinirse nuevos términos de pureza.

En este capítulo se establecen las definiciones de los distintos tipos de impurezas y el contexto en el cual se emplearán en esta Farmacopea.

En las monografías de principios activos se citan generalmente alguno de los siguientes tipos de ensayos de pureza:

(1) un ensayo de pureza cromatográfica acompañada de una valoración no específica;

(2) un método indicador de la pureza cromatográfica que, además, sirve como valoración, o

(3) un ensayo límite específico para una impureza conocida, lo que generalmente requiere una *Sustancia de referencia* para esa impureza.

Los métodos actuales de separación cumplen la doble función de separar y medir componentes simultáneamente o sea que permiten hacer mediciones de los analitos purificados. A pesar de esto, la mayoría de los métodos clásicos basados en volumetría, colorimetría, espectrofotometría o cambios en constantes físicas no han perdido vigencia. La situación ideal consiste en la obtención de un perfil de pureza a p artir de la aplicación de varios métodos analíticos.

Las mediciones de pureza o impureza en productos farmacéuticos representan un desafío a la hora de establecer la norma farmacopeica. Al momento de verificar la degradación de una preparación, los mismos métodos analíticos que sirven como indicadores de estabilidad son también indicadores de pureza. La resolución de un principio activo de los excipientes presentes en una formulación representa una situación similar, por esta razón, la mayoría de las monografías de productos terminados contienen valoraciones cromatográficas.

Cuando se conocen impurezas más significativas, algunas monografías establecen ensayos límites específicos. Sin embargo, en esta Farmacopea por lo general no se repiten ensayos de impurezas en preparaciones cuando éstas aparecen en la monografía correspondiente al principio activo y cuando no se espera que estas impurezas aumenten. Existe una uniformidad entre las normas de la Farmacopea y las *Buenas prácticas de fabricación para elaboradores, importadores/exportadores de medicamentos <1020>* y se asume que se realiza una retención apropiada de muestras que corresponden al lote de materia prima empleado para la preparación en cuestión. Cada vez que se planteen dudas sobre el análisis de una preparación oficial en cuanto a la calidad de las materias primas empleadas, es suficiente el análisis posterior de las muestras retenidas.

Definiciones

Sustancias extrañas - Son las sustancias extrañas que pueden introducirse por contaminación o adulteración, no son una consecuencia de la síntesis o de la preparación del producto y, por lo tanto, no pueden preverse cuando se seleccionan los ensayos y valoraciones para la monografía correspondiente. La presencia de sustancias extrañas objetables, no reveladas por los ensayos y las valoraciones de la monografía correspondiente, constituye una variación de la norma oficial. En esta Farmacopea se permite la detección de sustancias extrañas por métodos no oficiales.

Impurezas tóxicas - Las impurezas tóxicas tienen una significativa actividad biológica no deseable, aún en bajas concentraciones y requieren la identificación y cuantificación individual por medio de ensayos específicos. Estas impurezas pueden surgir de la síntesis, preparación o degradación de los productos farmacopeicos. Los ensayos se basan en la comparación contra una *Sustancia de referencia* de la impureza, si la hubiera. El elaborador tiene la responsabilidad de suministrar datos que sustenten la clasificación de tales impurezas cómo impurezas tóxicas.

Componentes concomitantes - Los componentes concomitantes son característicos de muchas materias primas empleadas en la elaboración de medicamentos y no se consideran como impurezas en el sentido farmacopeico. Para los componentes concomitantes de esta Farmacopea, se establecen límites de contenido, se especifican intervalos o mezclas definidas, como por ej., los isómeros geométricos y ópticos y antibióticos que sean mezclas. Cualquier componente que puede ser considerado como impureza tóxica debido a u n significativo efecto biológico nocivo, no es considerado como un componente concomitante.

Impurezas indicadoras - Las impurezas indicadoras son diferentes de las impurezas comunes ya que requieren identificación y cuantificación individual por medio de ensayos específicos. Estos ensayos se basan en la comparación contra una *Sustancia de referencia* de

la impureza, si la hubiera. Las impurezas indicadoras pueden incluir algunas impurezas o productos de degradación vinculados con el proceso y suministran información clave acerca del mismo, como por ej., sustancias diazotables en tiazidas. El elaborador tiene la responsabilidad de suministrar datos que apoyen la clasificación de tales impurezas como impurezas indicadoras en lugar de impurezas comunes.

Impurezas comunes - Las impurezas comunes son aquellas especies, presentes en materias primas empleadas en la preparación de medicamentos, que son inocuas por no tener significativa actividad biológica indeseable en las cantidades en que se presentan. Estas impurezas pueden surgir de la síntesis, la preparación o degradación de productos farmacopeicos. Los ensayos y valoraciones seleccionadas admiten cantidades de impurezas que no son objetables para el uso normal del producto. La presencia de impurezas comunes se controla en las monografías correspondientes de esta Farmacopea por medio del ensayo para *Impurezas comunes* <510>. Los ensayos para detectar sustancias relacionadas o pureza cromatográfica también pueden controlar la presencia de impurezas comunes.

A menos que se especifique de otro modo en la monografía correspondiente, la estimación de la cantidad y número de impurezas comunes se hace por métodos relativos en vez de la comparación directa contra *Sustancias de referencia* específicas.

Se ha seleccionado el valor de 2,0 % como límite general en impurezas comunes en las monografías correspondientes donde los datos disponibles no permitieron la adopción de otros valores. Este valor representa el máximo impacto permitido para esta fuente de variación.

Cuando una monografía fija los límites sobre componentes concomitantes, impurezas indicadoras y/o impurezas tóxicas, estas especies no se incluirán en la estimación de impurezas comunes, a menos que así se especifique en la monografía correspondiente.

1090. LIMPIEZA DE MATERIALES DE VIDRIO

El método empleado para eliminar la materia orgánica del vidrio es el tratamiento en frío con mezcla sulfocrómica, aunque debido a su carácter altamente contaminante del medio ambiente, deben tomarse precauciones especiales al momento de eliminar las porciones empleadas. Los agentes limpiadores alcalinos, tales como el fosfato trisódico y los detergentes sintéticos, son altamente eficaces pero requieren un prolongando enjuague.

La mezcla sulfocrómica para limpieza puede ser preparada del siguiente modo.

Dicromato de sodio	*200 g*
Agua	*100 ml*
Acido sulfúrico	*1.500 ml*

Disolver el dicromato de sodio en agua y lentamente agregar, con agitación, el ácido sulfúrico. Preparar esta mezcla en un vaso de precipitados de vidrio al borosilicato de 2 litros, puesto que el calor producido puede causar la rotura de envases de vidrio común.

El ácido crómico cristalino, que se forma al preparar la mezcla, tiende a precipitar y puede ser separado por decantación.

Como el vidrio tiende a absorber el ácido crómico, es imprescindible lavar perfectamente. Se debe evitar el uso de mezcla sulfocrómica o de soluciones altamente alcalinas para la limpieza de materiales que se empleen en mediciones ópticas.

La mezcla sulfocrómica es sumamente corrosiva e higroscópica y debe ser almacenada en botellas con tapón de vidrio en un lugar seguro. Cuando la mezcla adquiere color verde debe descartarse cumpliendo con todas las reglamentaciones vigentes sobre protección y seguridad del medio ambiente.

Cualquiera sea el procedimiento de limpieza que se emplee, es importante validar el método elegido para verificar que es apto para los fines empleados.

1095. POLIMORFISMO

Consideraciones generales

Se entiende por *Polimorfismo* a la capacidad de un compuesto en estado sólido de existir en dos o más formas cristalinas que tienen la misma composición química. Las sustancias que existen en estado sólido no-cristalino, son llamadas *amorfas*.

Cuando este fenómeno es observado para un elemento químico (por ejemplo azu fre), corresponde usar el término *alotropía* en lugar de polimorfismo.

El término *pseudopolimorfismo* se suele utilizar para describir solvatos (incluyendo hidratos) cuando un solvente se halla presente en la matriz cristalina en proporciones estequiométricas; el ámbito puede también extenderse incluyendo compuestos en los cuales el solvente esté atrapado en la matriz en proporciones variables. Dado que el término *pseudopolimorfismo* es ambiguo debido a su uso en diferentes circunstancias, además de las precedentemente mencionadas, es preferible usar los vocablos "solvatos" e "hidratos".

Cuando se indique que la sustancia *Presenta polimorfismo,* convencionalmente se involucra a cualquiera de las siguientes posibilidades: polimorfismo cristalino, solvatos, hidratos, formas amorfas o alotropía.

Aspectos Termodinámicos

Cuando un compuesto exibe polimorfismo, la forma termodinámicamente más estable a una determinada temperatura y presión es la que presenta menor energía libre. Las otras formas son estados metaestables. A temperatura y presión normales, una forma metaestable puede permanecer inalterada o transformarse en otra termodinámicamente más estable. Este proceso puede ser lento o veloz, en función de la cinética del mismo.

La relación de transformación entre un par de polimorfos de una sustancia en un determinado intervalo de temperatura puede ser *enantiotrópica* o *monotrópica*:

a) Es *enantiotrópica* cuando puede dividirse dicho intervalo de temperatura en dos zonas consecutivas, separadas por la temperatura de transición, siendo una de las formas polimórficas estable y la otra metaestable en la primera zona, mientras que en la segunda zona esa relación de estabilidad se invierte (las formas estable y metaestable en la primera zona son respectivamente metaestable y estable en la segunda). En este caso, como se ha mencionado, existe una temperatura de transición entre ambas formas y la transformación es reversible. Cuando la transformación de una forma en otra tiene lugar a través de calentamiento, la transformación inversa se produce en principio por enfriamiento.

b) Es *monotrópica* cuando en la totalidad del intervalo de temperatura en estudio, es estable solamente una de las dos formas. En este caso no existe temperatura de transición entre ambas y la transformación de la forma metaestable en la estable es irreversible.

Los diagramas de presión en función de la temperatura y de energía en función de la temperatura son herramientas valiosas para la total comprensión tanto de la relación energética (enantiotropismo, monotropismo), como de la estabilidad termodinámica de las modificaciones individuales de un compuesto polimórfico.

Obtención

Es posible obtener diferentes formas cristalinas o solvatos variando las condiciones de cristalización (temperatura, presión, solvente, concentración, velocidad de cristalización, sembrado del medio de cristalización, presencia y concentración de impurezas, etc.).

Propiedades

Para una misma sustancia, las distintas formas cristalinas y amorfas tienen el mismo comportamiento químico y físico cuando las moléculas están disueltas o cuando están fundidas, mientras que sus propiedades físico-químicas y sus características físicas en el estado sólido pueden ser ligera o ampliamente diferentes de acuerdo a la forma bajo la cual se presenten.

Las diferencias pueden encontrarse entre las siguientes propiedades:

- Forma y color de los cristales
- Propiedades térmicas (punto de fusión, calor de fusión, características de sublimación, entalpías de transición, calor específico, calores de reacción al estado sólido)
- Índice de refracción
- Diagramas de fase

- Densidad
- Dureza
- Resistencia mecánica
- Conductividad electrolítica
- Dilatabilidad
- Propiedades superficiales (tensión superficial, adsortibilidad, humectabilidad, cargas eléctricas superficiales, etc.)
- Solubilidad aparente*
- Reactividad química al estado sólido
- Estabilidad a los estímulos mecánicos (humedad, radiación, calor, etc.)
- Estabilidad
- Características inherentes al polvo y/o granulado (densidad, reología, compactación, etc.)
- Características inherentes a las formas farmacéuticas (dureza, plasticidad, porosidad, craqueabilidad, elasticidad, etc.)

(*Solubilidad aparente: concentración del material en equilibrio aparente (sobresaturación). La "solubilidad aparente" se diferencia de la definición termodinámica de "solubilidad", que es alcanzada a un tiempo infinito de equilibrio)

Esta diversidad de propiedades puede tener influencia en cualesquiera de los siguientes procedimientos:

Materias Primas:

- Diseño de proceso de síntesis;
- Elección de análisis cristalográficos adecuados;
- Estabilidad (condiciones de almacenamiento, vencimiento, envasado y otros).

Productos Terminados:

- Formulación;
- Diseño del proceso de fabricación;
- Adecuación de los análisis
- Estabilidad (condiciones de almacenamiento, vencimiento, envasado y otros).

Análisis

Las técnicas utilizadas para el análisis de polimorfismo son:

- Difracción de Rayos X (polvo y monocristal)
- *Análisis Térmico* <20> (Calorimetría Diferencial de Barrido, Termogravimetría, Termomicroscopía)
- Microcalorimetría
- Análisis de humedad de absorción
- *Determinación de punto de fusión* <260>
- Microscopía óptica y electrónica
- Resonancia Nuclear Magnética de estado sólido
- *Espectrofotometría de Absorción Infrarroja* <460>
- Espectrometría Raman
- Medición de solubilidad y velocidad intrínseca de disolución
- Medición de densidad

Estas técnicas son a menudo complementarias y es indispensable usar varias de ellas para una tipificación.

Para hidratos y solvatos, son recomendables las técnicas de Calorimetría Diferencial de Barrido, Termomicroscopía y Termogravimetría, combinadas con mediciones de Solubilidad, Velocidad de Disolución Intrínseca y Difracción de Rayos X.

1110. PREPARACIONES RADIOFARMACÉUTICAS

Ver *1110. Preparaciones radiofarmacéuticas* en *Apartado de Productos radiofarmacéuticos* en *Volumen III.*

1120. PRODUCTOS BIOTECNOLÓGICOS

INTRODUCCIÓN

En su aplicación a la industria farmacéutica, la Biotecnología se refiere al empleo de organismos vivos para la obtención de biofármacos. El objetivo de este documento está dirigido al empleo de la llamada Biotecnología de ADN recombinante, apoyada fundamentalmente en dos grandes avances tecnológicos.

Uno de ellos está representado por el empleo de las técnicas de ADN recombinante, ADNr (ingeniería genética), las cuales permiten transplantar genes de una especie en otra especie distinta. De esta manera, genes que codifican para la expresión de proteínas (generalmente humanas) pueden ser insertados en células hospedadoras procariotas o eucariotas, de tal forma que la célula hospedadora exprese grandes cantidades de la proteína deseada.

El otro avance se refiere al desarrollo de las técnicas que permiten obtener y emplear anticuerpos monoclonales: tecnología de hibridoma y líneas celulares transformadas.

Otras tecnologías, como las que permiten obtener plantas y animales transgénicos, la terapia genética y la tecnología de ADN antisentido, no están contempladas en este capítulo. El esquema regulatorio general para productos biotecnológicos es el mismo que para productos del mismo tipo obtenidos por métodos tradicionales, con el agregado de requerimientos específicos propios de su origen biotecnológico.

La finalidad de este capítulo es considerar los criterios para la elaboración y control de productos obtenidos a través de técnicas biotecnológicas.

CONSIDERACIONES GENERALES

El progreso de la genética molecular (biología molecular) y de la química de los ácidos nucleicos hizo posible identificar genes que codifican para proteínas biológicamente activas. Estos avances han permitido analizar esos genes en gran detalle y transferirlos de un organismo a otro a fin de obtener la expresión de los mismos en condiciones reguladas mediante una síntesis suficiente de los polipéptidos correspondientes.

Un gen se caracteriza por una secuencia particular de nucleótidos en la molécula de ADN. Cuando se separan las dos cadenas, cada una de ellas forma un molde para la síntesis de una copia complementaria y constituye un mecanismo para la reproducción fiel de los genes, conservando al mismo tiempo la secuencia lineal de los cuatro mononucleótidos que constituyen los componentes básicos. El proceso de decodificación de esta información y la síntesis del producto recombinante se cumplen en dos etapas: 1) la transcripción de la cadena del ADN que lleva la información genética en forma de ARN mensajero, ARNm y 2) la traducción de la información que porta la molécula de ARNm a un polipéptido.

Los avances científicos han permitido el empleo industrial de microorganismos o células transformadas mediante la inserción de un gen heterólogo, para la producción de proteínas de interés en diversos campos y en especial en el área de la salud humana.

Esta tecnología permite no sólo reproducir proteínas idénticas a las naturales, sino también elaborar proteínas modificadas y aún totalmente nuevas, mediante las alteraciones correspondientes en los genes a insertar. Es decir, proporciona la posibilidad de manejar este potencial para lograr moléculas iguales o más ventajosas que las naturales para una determinada función, como por ej., mayor actividad biológica, mayor vida media, menos efectos colaterales, etc. Sin embargo, hay que tener en cuenta que tales modificaciones estructurales con respecto a la proteína natural pueden potencialmente despertar, en el paciente tratado, una respuesta inmune o nuevos efectos adversos que invalidarían su aplicación. Cabe aclarar que en caso de obtenerse un producto ventajoso dentro de esta categoría (línea) éste deberá ser evaluado en función de una relación beneficio-riesgo.

Un gen de origen natural, un ADN copia, ADNc, o una secuencia de nucleótidos obtenida por síntesis, que codifique para un determinado producto, puede propagarse insertándose en un vector apropiado. Se emplean con este fin enzimas muy específicas denominadas endonucleasas de restricción (que causan la segmentación del ADN del vector en sitios preestablecidos) y ligasas (que unen el ADN insertado al vector), luego de lo cual el vector se introduce en un organismo hospedador apropiado.

El siguiente paso corresponde a la incorporación del vector modificado en la célula hospedadora elegida, siguiendo la selección de los clones que han incorporado la información genética apropiada para la elaboración del producto.

La etapa siguiente se refiere al desarrollo de un sistema de propagación en cultivo masivo, en forma tal de obtener una expresión eficiente del producto recombinante deseado.

La elección del organismo hospedador, sea éste procariota (bacteria) o eucariota (células de mamíferos, levaduras), es la resultante de diversos factores que abarcan desde la complejidad de la molécula a producir hasta la economía y eficiencia del proceso de fermentación o cultivo celular.

El profundo conocimiento sobre la biología molecular de *Escherichia coli*, hizo que inicialmente fuese elegido este microorganismo en diversos sistemas de producción en biotecnología.

Actualmente también existen en el mercado diversos productos obtenidos por medio de cultivos de células eucariotas modificadas genéticamente en gran escala, para diversos procesos biotecnológicos productivos.

Por lo tanto, podemos agrupar los procesos biotecnológicos de acuerdo al organismo productor seleccionado en:

A - Sistemas biotecnológicos procarióticos (bacterias).

B - Sistemas biotecnológicos eucarióticos (células de mamíferos y levaduras).

Los factores que influyen en la expresión de genes extraños introducidos en un nuevo hospedador son múltiples y muy complejos. Por lo tanto, los procesos de este tipo deberán estar diseñados para garantizar y controlar la estabilidad de toda la construcción genética insertada a fin de asegurar la homogeneidad y uniformidad de la proteína producida por el hospedador a lo largo de múltiples generaciones.

A - Sistemas biotecnológicos procarióticos (bacterias)

El plásmido recombinante es el elemento clave de esta tecnología. Contiene el gen previamente aislado que codifica para la proteína de interés. Los plásmidos están formados por ADN bacteriano, son circulares, pequeños, extracromosomales y se autorreplican.

Básicamente, esta tecnología involucra el clivado enzimático específico del plásmido bacteriano y la posterior inserción del gen de interés. De esta manera se obtiene el plásmido recombinante que al ser introducido en el microorganismo hospedador, mediante el proceso de transformación le confiere la propiedad de dirigir u orientar la síntesis de la proteína deseada.

La expresión de proteínas recombinantes en bacterias ofrece tanto ventajas como inconvenientes. Como se mencionó anteriormente la biología y fisiología bacterianas se conocen en profundidad y existe amplia documentación que demuestra el seguro y eficaz empleo de bacterias como organismo hospedador.

Los productos procedentes de genes heterólogos expresados en hospedadores extraños pueden diferir de sus equivalentes naturales desde el punto de vista estructural, biológico o inmunológico. Esas diferencias pueden surgir ya sea en el nivel genético, con posterioridad a la traducción o a la transcripción o durante el proceso de fermentación y de purificación.

Por lo tanto, estos sistemas poseen limitaciones, algunas de las cuales se enumeran a continuación:

a) La proteína biosintetizada en el interior de la célula se encuentra en un estado químicamente reducido, sin la presencia de los correspondientes puentes disulfuro que estabilizan la estructura espacial de la molécula nativa.
Es necesario efectuar *in vitro*, en condiciones perfectamente definidas y controladas, la oxidación que posibilite la formación de los puentes disulfuro intramoleculares y en consecuencia la estabilización de la estructura molecular terciaria.
De formarse sustancias no deseadas (oligómeros, puentes disulfuro intermoleculares y/o erróneos, etc.) las mismas deberán ser eliminadas en el proceso de purificación. Además es fundamental controlar la presencia de estas formas moleculares en el producto final.

b) Todas las proteínas producidas por bacterias comienzan su secuencia de aminoácidos con un residuo de *N*-formil-metionina, el que no siempre es eliminado por los sistemas enzimáticos específicos (metilamino peptidasa-MAP), por lo que la proteína resultante podría iniciar su secuencia con esta modificación respecto a la proteína nativa.
Los avances en la biología molecular de la *Escherichia coli* han conducido a la obtención de la expresión de proteínas en el espacio periplásmico de la bacteria. Esta forma de expresión permite la remoción de la metionina *N*-terminal no deseada y la obtención de proteínas en mayor grado de pureza.

c) Durante el proceso de fermentación bacteriana y en la etapa de aislamiento y purificación posterior (*downstream*) debe controlarse la acción proteolítica de exo y endo-proteasas bacterianas, a fin de evitar la degradación de la proteína recombinante.

d) Es necesario controlar la acción de las deamidasas bacterianas que al hidrolizar

residuos de glutamina o asparagina dan lugar a la formación de isoformas ácidas, con el correspondiente cambio de estos aminoácidos a áci do glutámico y ácido aspártico, respectivamente.

e) Como las endotoxinas son lipopolisacáridos producidos por microorganismos Gram (-) es necesario eliminar durante la purificación importantes cantidades de estas sustancias.

f) Las bacterias carecen de sistemas enzimáticos capaces de glicosilar proteínas, pudiendo en determinadas ocasiones llegar a d ar como resultado moléculas de baja actividad biológica *in vivo*, menor solubilidad, baja vida media y alta antigenicidad. Por lo tanto, esto deberá tenerse en cuenta si se desea producir una proteína que sea naturalmente glicosilada y en la cual su patrón de glicosilación esté comprometido con las características farmacológicas de la proteína.

B - Sistemas biotecnológicos eucarióticos (células de mamíferos y levaduras)

Líneas celulares de mamíferos - Se ha establecido en la industria farmacéutica el empleo de cultivo de células de mamíferos para la producción de vacunas y se cuenta con la información necesaria para asegurar la adecuación de estos productos en medicina humana. Como extensión de esta tecnología se desarrollaron procesos productivos basados en el cultivo masivo de células transformadas de mamíferos, tratando de dar respuesta a las limitaciones productivas de las bacterias.

Las células eucariotas tienen la capacidad de glicosilar las proteínas que sintetizan, las que usualmente son exportadas al medio con sus estructuras primaria, secundaria y terciaria similares a las proteínas nativas humanas.

Basado en la preocupación existente por la potencial presencia de oncogenes y posibles contaminaciones virales y retrovirales, es necesario contar con líneas inmortales, feno y genotípicamente caracterizadas que aseguren la estabilidad del proceso, además del exhaustivo análisis y caracterización de los bancos maestros celulares que permitan así, en su conjunto, minimizar este riesgo potencial.

Otras células eucariotas - Es posible también lograr muchas de las ventajas conformacionales y post-transcripcionales descritas empleando otras células eucariotas, como levaduras (como por ej., *Saccharomyces cereviseae*) y líneas originarias de insectos.

Estos sistemas ofrecen varias ventajas teóricas con respecto a bacterias, a la vez que generan nuevas preocupaciones. Por ej., el patrón de glicosilación es diferente al de las células de mamífero, pudiendo en determinadas ocasiones llegar a dar como resultado moléculas de baja actividad biológica *in vivo*, menor solubilidad, baja vida media y alta antigenicidad. Por lo tanto, esto deberá tenerse en cuenta si se desea producir una proteína que sea naturalmente glicosilada y en la cual su patrón de glicosilación esté comprometido con las características farmacológicas de la proteína.

Producción de anticuerpos monoclonales - Los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en dos formas, según sea su origen murino o humano.

En el caso de los anticuerpos monoclonales murinos, se fusionan linfocitos provenientes del bazo de ratones previamente inmunizados, con una línea celular inmortal de ratón (mieloma). Los hibridomas así obtenidos son posteriormente seleccionados y clonados.

Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se seleccionan por su especificidad inmunológica linfocitos B humanos, los que son inmortalizados.

La célula resultante fusionada o transformada podrá proliferar indefinidamente en un biorreactor o cultivo celular o podrá ser inyectada en ratones a partir de cuyo líquido ascítico se podrá aislar la proteína.

En todos estos casos los anticuerpos deberán ser tratados como productos obtenidos en células de mamíferos.

En algunas circunstancias se puede recurrir a la humanización de anticuerpos murinos y los mismos deberán ser considerados de acuerdo al sistema de producción como productos recombinantes.

Biofármacos producidos por recombinación de ADN

La principal diferencia entre los productos farmacéuticos tradicionales y los biotecnológicos radica en que estos últimos son producidos por organismos vivos modificados genéticamente. En esta categoría se incluyen tanto las proteínas o polipéptidos derivados de ADN recombinante, como así también los anticuerpos monoclonales. Los productos biotecnológicos se diferencian de aquellas proteínas y polipéptidos obtenidos de fuentes naturales o resultantes de la síntesis química únicamente por su método de obtención.

En las etapas de elaboración estrictamente galénicas todos los productos farmacéuticos,

inclusive los de origen biotecnológico, comparten plenamente los mismos requisitos básicos para la validación de procesos, el control ambiental, la elaboración aséptica y los sistemas de control de calidad. Sin embargo, los sistemas biotecnológicos presentan con frecuencia un mayor grado de complejidad en las etapas de elaboración propiamente dicha.

Los productos derivados del ADN recombiante pueden contener contaminantes potencialmente perjudiciales que normalmente no se hallan presentes en los equivalentes preparados con los métodos ordinarios y en consecuencia el proceso de purificación debe ser capaz de eliminarlos. Son ejemplos de ello las endotoxinas en productos expresados en células bacterianas, y el ADN celular y virus contaminantes en los derivados de células animales.

Preocupa especialmente la contaminación con ácido nucleico procedente de células transformadas de mamíferos debido a la posible presencia de ADN potencialmente oncogénico. El procedimiento de elaboración elegido condicionará la naturaleza y el nivel de los posibles contaminantes.

La posible variabilidad del sistema durante la elaboración puede llevar a modificaciones que favorezcan la expresión de otros genes en el sistema hospedador-vector o que produzcan menor rendimiento del producto o diferencias cuantitativas y cualitativas de las impurezas presentes. La producción de cultivos continuos es objeto de consideraciones similares.

Es indispensable, por lo tanto, contar con procedimientos que aseguren la uniformidad de las condiciones de elaboración y del producto final.

A modo de generalización, los procesos de elaboración biotecnológicos incluyen las siguientes etapas:

Etapa de expansión celular (upstream) - Consiste en la obtención de una gran masa del organismo elaborador a través de los procesos de fermentación bacteriana o cultivo celular masivo, al fin de los cuales se cuenta con la biomolécula impura y en condiciones de pH, fuerza iónica, estado de agregación, etc., que deben ser modificadas para su posterior procesamiento.

Purificación (downstream) - Encadenamiento lógico de procesos que, partiendo del material anterior, debe producir una molécula del grado de pureza requerido, conservando plenamente su actividad biológica y terapéutica. El proceso de *downstream* debe asegurar que el producto cumpla todos los criterios de aceptabilidad para ser empleado como principio activo.

Es posible agrupar los diferentes pasos que conforman el *downstream* en dos grandes etapas: *Recuperación y Purificación*.

Recuperación - Mediante el empleo de diversas metodologías (micro y ultrafiltración, centrifugación, precipitación salina o con solventes, diafiltración, rotura celular, extracción en dos fases o con solventes, etc.), el material proveniente del proceso de *upstream* es llevado a co ndiciones previamente definidas, obteniéndose la materia prima cruda (principio activo de baja pureza) para su posterior purificación.

Purificación - La materia prima cruda se purifica, mediante diversos métodos, como por ej., cromatografía líquida de inmuno-afinidad, intercambio fónico, exclusión molecular, interacción hidrofóbica, enfoque y en fase reversa. El material resultante puede ser denominado principio activo puro o materia prima pura.

Acondicionamiento - Como ocurre con cualquier principio activo, la materia prima pura debe ser acondicionada para lograr un producto semielaborado (granel) que respete todos los requisitos correspondientes a un producto farmacéutico.

ALCANCE DE LAS CONSIDERACIONES

Estas consideraciones abarcan las siguientes áreas:

1. Los materiales iniciales, incluidos los datos básicos de la célula hospedadora y del origen, naturaleza y secuencia del gen empleado en la producción.
2. Su proceso de elaboración.
3. La materia prima pura.

Los productos derivados del ADN recombinante y de la tecnología de hibridoma (anticuerpos monoclonales) se consideran similares a las sustancias biológicas producidas por los métodos tradicionales, como las vacunas bacterianas y virales, en las que el control apropiado de los materiales iniciales y del procedimiento de fabricación es tan necesario como el del producto mismo.

Estas consideraciones, por tanto; ponen énfasis en los controles durante la preparación para asegurar la inocuidad y eficacia del producto y en la caracterización integral del producto.

También se considera esencial la validación del proceso de fabricación, así como la del procedimiento de purificación para eliminar los materiales no deseados.

Se deben tener en cuenta las normas generales para el control de la calidad de los productos biotecnológicos, por tanto, habrá que prestar especial atención a la calidad de todos los reactivos

empleados en la elaboración, incluidos los componentes de los medios de fermentación y cultivo. Si se emplean aditivos de origen animal (como por ej., suero fetal bovino) se debe demostrar que están exentos de agentes adventicios.

No es conveniente emplear en la producción ningún agente que se sabe provoca reacciones alérgicas en ciertos individuos, como penicilina u otros antibióticos betalactámicos.

Los productos biotecnológicos deben satisfacer las normas generales para el control de la calidad de los productos biológicos, como ensayos de actividad, toxicidad, piretógenos, estabilidad y esterilidad, además de controles que aseguren la identidad y pureza de la molécula obtenida comparándola contra una de referencia, así como un conjunto de ensayos que verifiquen su integridad, grado de agregación, secuencia correcta de aminoácidos, etc.

Las consideraciones para un producto deben reflejar, además, el uso clínico al que se lo destina. Así, una preparación que ha de administrarse en forma reiterada por un largo período de tiempo, o en grandes dosis, probablemente necesite someterse a minuciosos ensayos para investigar la presencia de vestigios de contaminantes antigénicos, lo que puede ser menos estricto para un producto que se aplica una sola vez (como por ej. una vacuna).

Se deben fijar límites máximos permisibles, para impurezas y contaminantes que pueden estar presentes en estos productos, adecuando los límites, de acuerdo con el avance tecnológico.

CIonado y expresión

La tecnología de ADN recombinante comprende el reordenamiento sistemático y la manipulación de segmentos específicos de ácido nucleico para la construcción de genes circulares o plásmidos, las cuales, cuando son introducidas en un hospedador apropiado, darán origen a la molécula deseada.

Existen en general tres métodos para la obtención de un segmento codificante específico:

1. Transcripción reversa del ARN a ADNc;
2. Aislamiento del ADN genómico;
3. Síntesis química.

Se debe proveer información lo más detallada posible respecto de:

Caracterización de la célula hospedadora (eucariota o pr ocariota), incluyendo origen, fenotipo, genotipo y descripción del medio de cultivo.

En el caso de emplearse células eucariotas cono hospedadoras debe proveerse la historia de la línea celular y las características generales de la misma.

Deben determinarse el patrón de crecimiento y el aspecto morfológico de la línea celular, que debe ser estable desde el banco celular maestro hasta el final de la elaboración. Si existiesen marcadores específicos que puedan ser útiles en la caracterización de la línea celular (como cromosomas marcadores, marcadores específicos de superficie), éstos deben ser caracterizados para determinar la estabilidad de la misma.

Si las células tienen una expectativa de vida finita, debe determinarse el número total de duplicaciones de la población hasta el envejecimiento.

Documentación respecto de la estrategia de clonado del gen y caracterización del vector recombinante, incluyendo:

1. Origen, caracterización del gen clonado y análisis de la secuencia nucleotídica del mismo.

2. Análisis de la secuencia nucleotídica de las regiones de control adyacentes al vector de expresión. Es conveniente incluir una explicación del origen y función de las partes componentes del vector, como los orígenes de replicación, marcadores de resistencia a an tibióticos; promotores, secuencias moduladoras (*enhancers*), si el producto ha de ser sintetizado o n o como una proteína de fusión, como así también un mapa de digestión con enzimas de restricción, indicando al menos aquellos sitios empleados en la construcción.

3. Construcción genética, estructura del vector de expresión completo y mapa de restricción.

Caracterización del sistema hospedador-vector, incluyendo:

1. Mecanismo de transferencia del vector a la célula hospedadora (transfección, infección, microinyección, etc.).

2. Número de copias, estado físico (integrado o extracromosomal) y estabilidad del vector en la célula hospedadora.

3. Métodos empleados para promover y controlar la expresión.

Bancos celulares

Una vez que se ha elegido una línea celular como fuente biológica de un producto, se debe generar un sistema de banco de células para garantizar que exista una fuente apropiada de células equivalentes para emplear a través del lapso de vida del producto.

Usualmente existe un banco celular maestro (BCM) y un banco celular de trabajo (BCT). Los bancos celulares pueden ser tanto de células eucariotas como procariotas.

Además de proveer una fuente constante de material de partida, las ventajas de un sistema de bancos celulares incluyen la capacidad de contar con una detallada caracterización de la línea celular y una disminución de las posibilidades de

contaminaciones con otras líneas celulares o con otros microorganismos.

Banco celular maestro (BCM) - Es una suspensión homogénea de células originales ya transformadas con el vector de expresión conteniendo el gen deseado, la cual es distribuida en volúmenes iguales dentro de recipientes individuales en condiciones definidas (como por ej., en nitrógeno líquido).

En algunos casos puede ser necesario establecer BCM separados para el vector de expresión y la célula hospedadora. Se deben documentar cuidadosamente la localización, identificación e inventario de las ampollas individuales.

Se deben realizar todos los ensayos de identidad del BCM necesarios para establecer las propiedades significativas de las células (marcadores fenotípicos y genotípicos relevantes) y la estabilidad de esas propiedades a través del tiempo. Deben proveerse datos demostrando que las células pueden ser empleadas para el propósito deseado. También deben obtenerse datos para demostrar el número de copias e i dentidad del sistema de expresión, la calidad y cantidad de la proteína que éste produce.

Debe confirmarse la secuencia de nucleótidos del gen clonado en el estado de BCM. Sin embargo, en ciertos casos, como cuando se insertan copias múltiples del gen clonado en el genoma de una línea celular continua, la secuenciación puede ser inapropiada. En tales circunstancias, puede ser útil realizar un análisis de *Southern blot* sobre el ADN celular total o bien el análisi de *Nolhern blot* o de la secuencia del ARNm.

Si fuera necesario generar un nuevo BCM por transferencia de la construcción de expresión en células hospedadoras seguida por una selección de las células clonadas deseadas, se deben describir los criterios de aceptación que permitan garantizar la identidad del clon y la proteína producida en referencia a la original.

Banco celular de trabajo (BCT) - Es una suspensión homogénea de células derivadas del BCM luego de un número definido de pasajes, distribuida en volúmenes iguales dentro de recipientes individuales para su almacenamiento (como por ej., en nitrógeno líquido). La localización, identificación e inventario de las ampollas individuales deben ser cuidadosamente documentados.

Para la elaboración de un lote de producto biológico pueden ser empleados uno o más recipientes del BCT. Si se emplean células de más de un recipiente, las suspensiones celulares deberán ser mezcladas en el momento de descongelarlas. El nivel de duplicación de la población de las células empleadas para la elaboración se basará en criterios escritos establecidos por el elaborador asegurando la integridad del sistema célula - producto.

En ambos bancos:

- Todos los recipientes deberán ser tratados de la misma manera durante el almacenamiento y, una vez retirados del lugar de depósito de células, los mismos deberán ser descargados.
- Se recomienda que cada uno de los BCM y BCT sean almacenados en dos o m ás áreas lo suficientemente separadas dentro de las instalaciones de producción, así como en un sitio distante para evitar la pérdida de la línea celular.

Un banco celular puede ser empleado para la elaboración en *Cultivos con número definido pasajes* o bien en *Cultivos continuos*.

Cultivos con número definido de pasajes - Este método de cultivo es definido por un número definido de pasajes o duplicaciones de la población, el cual no debe ser superado durante el proceso de elaboración. Se debe definir el máximo número de duplicaciones, o pasajes, durante los cuales rutinariamente el proceso de elaboración cumple con los criterios expresados más arriba.

Deberán describirse en detalle los procedimientos y materiales empleados para la propagación de las células y para la inducción del producto. En cada tanda de elaboración se deben suministrar datos sobre el alcance y naturaleza de cualquier contaminación microbiana de los recipientes de cultivo inmediatamente antes de la recolección, indicándose la sensibilidad de los métodos empleados para detectarla.

Se deben presentar datos sobre la uniformidad de las condiciones de fermentación y de la propagación de los cultivos sobre el mantenimiento del rendimiento del producto. Se deben establecer los criterios que han de aplicarse para descartar lotes de cultivo. Se debe determinar el número máximo de duplicaciones celulares o cantidad de pasajes permitidos durante la elaboración.

Se deben observar las características de la célula hospedadora y el vector al final de los ciclos de elaboración. De ser pertinente, se debe determinar la secuencia de nucleótidos de la inserción que codifica el producto derivado del ADN clonado, por lo menos una vez después del cultivo en gran escala de cada lote de siembra inicial.

Cultivos continuos - A través de este método el número de pasajes o duplicaciones de la población no está definido ni restringido desde el comienzo de la elaboración. El elaborador debe definir los criterios adoptados tanto para la cosecha celular como para la terminación del proceso de elaboración. Durante la etapa de cultivo, el mismo debe ser monitoreado, la frecuencia y el tiempo de

monitoreo requerido dependen de la naturaleza del sistema de elaboración y del producto. El elaborador debe definir e informar los sistemas de monitoreo adoptados.

Debe aportarse información referente a l a integridad del gen que está siendo expresado y a las características fenotípicas y genotípicas de la célula hospedadora luego de un tiempo prolongado de cultivo. De ser pertinente, se debe determinar la secuencia de nucleótidos de la inserción que codifica el producto derivado del ADN clonado, por lo menos una vez después del cultivo en gran escala de cada lote de siembra inicial. Sin embargo, en ciertos casos, como cuando están insertadas múltiples copias del gen clonado en el genoma de una línea celular continua, secuenciar el gen clonado puede ser inapropiado.

En tales circunstancias, puede ser útil un análisis de *Southern blot* sobre el ADN celular total o bien el análisis de *Nothern blot* o realizar la verificación de la secuencia del ARNm; en esos casos debe tenerse una atención particular en la caracterización del producto final.

Además se debe contar con datos que demuestren que las variaciones en el rendimiento no sobrepasen los límites establecidos. La aceptación de suspensiones para más operaciones debe estar claramente vinculada al programa de control adoptado y se requiere contar con una definición clara del lote del producto que se ha de someter a más operaciones.

También se deben establecer los criterios para descartar suspensiones y/o suspender los cultivos. Se deben efectuar ensayos sistemáticos para investigar la contaminación microbiana de acuerdo con la estrategia de recolección.

Se debe especificar el período máximo de cultivo continuo, basándose en la información sobre la estabilidad del sistema y la uniformidad del producto durante y después de este período. En los cultivos continuos prolongados, la línea y los productos celulares se evaluarán reiteradamente a intervalos determinados de acuerdo a la información obtenida sobre la estabilidad del sistema hospedador-vector y las características del producto.

Control de calidad de los bancos celulares - El control de calidad de los bancos celulares debe incluir información referente a:

1. Estabilidad a través de medidas de viabilidad y de retención del vector.

2. Identidad celular a través de su caracterización fenotípica.

3. Contar con evidencias que demuestren que los bancos celulares están libres de agentes infecciosos potenciales u oncogénicos (virus, bacterias, hongos o micoplasmas). Debe prestarse especial atención a l os virus que comúnmente contaminan a l a especie de la cual deriva la línea celular. Ciertas líneas celulares contienen virus endógenos, como por ej., retrovirus, cuya eliminación puede no ser factible. La expresión de estos organismos, bajo una variedad de condiciones que se conocen como causantes de su inducción, debe ser ensayada. Los lotes de siembra deben estar exentos de todo contaminante adventicio.

Este punto no corresponde en el caso de bacterias, hongos o levaduras.

4. La oncogenicidad potencial del banco celular, en el caso de células eucarióticas derivadas de mamíferos.

5. Registros fidedignos de la composición y origen de los medios de cultivo empleados para los bancos celulares.

Debido a que los sueros de animales pueden producir respuestas alérgicas en seres humanos, deben realizarse esfuerzos para reducir los niveles de suero requeridos para la propagación y elaboración en cultivos celulares tanto como sea posible. La cantidad residual de suero o aditivos en el producto final debe ser determinada y no exceder los límites establecidos.

Si en el pasaje de células se emplea tripsina porcina, debe estar libre de agentes adventicios, incluyendo parvovirus porcino.

Los elaboradores de productos biológicos deben proveer información respecto a l a/s fuente/s y controles de cualquier material derivado de fuentes animales.

No deben estar presentes en los cultivos de células de elaboración, penicilina u otros antibióticos beta lactámicos. Pueden ser aceptables mínimas concentraciones de otros antibióticos o agentes inductores.

Materia prima pura

Caracterización e identificación - Los requisitos de identidad, pureza, actividad y estabilidad del producto están estrechamente relacionados con la tecnología de procesamiento empleada y las características fisicoquímicas y biológicas de un principio activo específico, debiendo tenerse en cuenta el uso previsto para el producto.

En el control de calidad de productos obtenidos por tecnología de ADN recombinante es frecuente emplear la combinación de ensayos validados para el producto final y durante el proceso para asegurar la eliminación de impurezas no deseadas hasta alcanzar los niveles requeridos por la Autoridad Sanitaria.

Resulta esencial la caracterización rigurosa del principio activo mediante métodos químicos, físicos y biológicos.

METODOLOGÍA ANALÍTICA

Consideraciones de Sustancias de referencia - El empleo de *Sustancias de referencia* es extremadamente importante en el análisis de los productos obtenidos mediante la tecnología de ADN recombinante.

Se encuentran disponibles *Sustancias de referencia* con unidades definidas de actividad para varios productos biológicos, provenientes de fuentes reconocidas. Se deben emplear *Sustancias de referencia* específicas vigentes para cada producto; dado que con el tiempo pueden ser reemplazados por los organismos que las controlan.

Contenido proteico - La cuantificación de proteínas en un producto dado es una determinación importante por sí misma y también porque los resultados de otras valoraciones, como por ej., la actividad específica, dependen del contenido proteico.

Existen varios métodos aceptados para la determinación del contenido proteico, como absorbancia ultravioleta, fluorescencia, métodos de Lowry, de Bradford y de Kjeldahl.

Análisis de aminoácidos (Identificación y/o contenido proteico).

Secuenciación proteica (Identificación) -
Amino - terminal.
Carboxilo - terminal.
Mapa Peptídico (Identificación).

Valoraciones imnunológicas.

Electrofresis -
SDS - PAGE.
Isoelectroenfoque.
Electroforesis capilar de alta resolución (HPCE).

Métodos cromatográficos -
CLAE en fase reversa.
CLAE de intercambio iónico.
CLAE de exclusión molecular.
Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

Determinación de ADN - El ADN residual de la célula hospedadora es una posible impureza, diferente en cada producto porque depende del organismo hospedador y del proceso de purificación.

Los niveles de ADN deben ser cuantificados empleando métodos con una sensibilidad apropiada.

Entre las técnicas empleadas pueden mencionarse:

- Hibridación en dot-blot empleando sondas específicas marcadas con ^{36}P.
- Tecnología de biosensores.
- Tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- *Determinación de carbohidratos* - La glicosilación (unión covalente de cadenas de oligosacáridos a la cadena peptídica) es una posible modificación posterior a l a traducción de ARNm. Es característica de las proteínas recombinantes que se expresan a partir de líneas de células eucariotas.

La glicosilación puede tener influencia sobre la farmacocinética y la función de la proteína de modo que cambios en la glicosilación pueden tener impacto significativo sobre las características farmacodinámicas y la eficacia terapeútica de un producto.

La glicosilación es un indicador sensible del control del proceso.

Idealmente, un producto debería ser caracterizado, al menos una vez, en cuanto a l a identificación de los sitios de glicosilación como así también del carbohidrato específico de cada sitio.

La cuantificación de los azúcares específicos y carbohidratos totales debería realizarse en cada lote. En algunos casos, el predominio de ácido siálico puede hacer del isoelectroenfoque en una técnica útil como una alternativa a la cuantificación de azúcares específicos en cada lote. Es óptimo fijar especificaciones acerca de la cantidad de cada isoforma para la liberación de los lotes como así mismo conocer la actividad específica de cada una de ellas.

Se pueden adoptar dos enfoques principales para determinar los azúcares unidos en forma covalente a la glicoproteína. Ambos dan por sentado que la microheterogeneidad es un fenómeno común entre las glicoproteínas y que la información representa correctamente la composición promedio o la estructura representativa. El primer enfoque es la determinación de la composición de azúcares unidos a una glicoproteína. El segundo es liberar y separar las estructuras de oligosacáridos individuales unidas covalentemente a la misma. Este último, permite obtener un mapa de oligosacáridos análogo al mapeo peptídico para una proteína.

Impurezas y contaminantes potenciales en productos biológicos - Los contaminantes que se pueden encontrar en la materia prima provienen básicamente de tres fuentes:

1 - Organismo hospedador: Proteínas del hospedador. ADN del hospedador.

2 - Proteínas e impurezas del proceso productivo-purificación:

3 - Impurezas relacionadas al principio activo proteína.

La pureza de una preparación proteica obtenida por tecnología de ADN recombinante debe ser máxima. Los niveles permitidos de trazas de contaminantes de cada producto serán especificados en la monografía correspondiente.

En la *Tabla* se describen los tipos de impurezas o contaminantes más frecuentes, indicando los métodos de detección más idóneos:

Tabla. Impurezas potenciales y/o agentes contaminantes.

	Método de detección / cuantificación
Impurezas	
Endotoxinas	Ensayo de endotoxinas bacterianas; ensayo de piretógenos.
Proteínas de la célula hospedadora	SDS-PAGE[a], inmunoensayos.
Otras impurezas proteicas	SDS-PAGE[a], CLAE[b], inmunoensayos.
ADN	Hibridación de ADN, espectrofotometría ultravioleta, PCR[c].
Proteínas mutantes	Mapeo peptídico, CLAE, IEF[d], espectrometría de masa, secuenciación de aminoácidos.
Formil-metionina	Mapeo peptídico, CLAE, espectrometría de masa, degradación de Edman.
Metioninas oxidasas	Mapeo peptídico, análisis de aminoácidos, CLAE/Fase reversa, degradación de Edman, espectrometría de masa.
Clivado proteolítico	IEF, SDS-PAGE en condiciones reductoras, CLAE, secuenciación de aminoácidos.
Agregados proteicos	SDS-PAGE, CLAE/SEC[e]
Deamidación	IEF, CLAE, espectrometría de masa, secuenciación de aminoácidos, degradación de Edman.
Anticuerpos monoclonales	SDS-PAGE, inmunoensayos.
Sustitución de aminoácidos	Análisis de aminoácidos, mapeo peptídico, espectrometría de masa, degradación de Edman.
Contaminantes	
Microbianos (bacterias, levaduras, hongos)	Control higiénico, ensayo de esterilidad, ADN (f)[f]
Micoplasma	PCR, ADN (f)
Virus (endógenos y exógenos)	ECP[g], Had[d] (virus exógenos solamente), act. Transcriptasa reversa, MAP[i], PCR.

a. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).
b. Cromatografía líquida de alta eficacia.
c. Reacción en cadena de la polimerasa.
d. Isoelectroenfoque.
e. Cromatografía de exclusión molecular de alta resolución.
f. Fluorocromo unido a ADN.
g. Efecto citopático.
h. Hemoadsorción.
i. Producción de anticuerpos murinos.

Ensayo biológico para identidad y potencia - Los métodos para determinar la potencia de productos biológicos obtenidos por técnicas de ADN recombinante son de fundamental importancia, pues miden la actividad del producto.

La actividad biológica, expresada en unidades internacionales, debe conservar una estricta relación directa con la masa del producto. Esto significa que el efecto biológico medido (actividad) por unidad de masa debe comportase como una constante acotada dentro de límites claramente especificados y autorizados. La actividad expresada por unidad de masa se denomina actividad específica y constituye un parámetro de identidad y/o pureza.

Esencialmente hay dos métodos para cuantificar la actividad: *Análisis empleando un modelo animal* y *Análisis basados en cultivos de células*. Para medir la masa se realizan *Análisis fisicoquímicos*.

Cada uno de estos métodos es de frecuente aplicación en el control de calidad de productos biológicos.

Análisis empleando un modelo animal - Los análisis biomiméticos en modelos animales han sido empleados rutinariamente, desde hace mucho tiempo, en el control de calidad de productos biológicos. A pesar de su larga historia, tienen una serie de desventajas como la necesidad de un gran número de animales de características definidas, contar con instalaciones apropiadas y personal debidamente capacitado para el manejo de los animales, largo tiempo de análisis (días semanas). Se emplean en aquellos casos donde los análisis basados en cultivos de células o e n métodos fisicoquímicos no dan resultados más confiables que los biomiméticos. Se podrán emplear métodos fisicoquímicos cuando se especifique en la monografía correspondiente.

La ventaja esencial de este tipo de métodos reside en que son los únicos capaces de reflejar fielmente la integridad y apropiada disponibilidad de la molécula biológica para expresar el efecto deseado.

Análisis basados en cultivo de células (in vitro) - Los análisis basados en cultivo de células proveen información sobre el efecto del producto biológico en un sistema vivo, pero pueden dar menos información sobre el estado conformacional de la molécula (integridad y reconocimiento por receptores específicos) que cuando se utilizan animales. El hecho que estos métodos puedan ser automatizados y que puedan ser repetidos un gran número de veces permite obtener resultados reproducibles.

Los bioanálisis basados en cultivo de células pueden ser divididos en dos grupos:

a) Los que necesitan cultivos primarios, de origen humano o animal.

b) Los que requieren líneas celulares en cultivo continuo, como por ej., la medición del efecto de citoquinas, ya sea promoviendo la actividad celular o bien inhibiendo la actividad o secreción de otras citoquinas.

Análisis por métodos fisicoquímicos - Este grupo de análisis no se basa en un modelo vivo sino que, generalmente, tienen en cuenta la acción química de un producto biológico. Estos métodos son comparativamente simples, rápidos, precisos y exactos. Otra ventaja de este tipo de análisis, por su precisión y exactitud, es que pueden ser empleados para proveer resultados confiables de la estabilidad del producto. La principal desventaja de estos métodos es que pueden ser insensibles a cambios en la molécula, con la lógica divergencia con la actividad en sistemas biológicos.

1125. SUSTRATOS CELULARES PARA LA PRODUCCIÓN DE VACUNAS DE USO HUMANO

Ver *1125. Sustratos celulares para la producción de Vacunas de Uso Humano* en *Apartado de Vacunas* en *Volumen III.*

1130. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las buenas prácticas de fabricación y control requieren que los métodos analíticos empleados para evaluar las especificaciones establecidas sean apropiados.

PRESENTACIONES DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Las presentaciones de métodos analíticos nuevos o revisados deben contener suficiente información para permitir la evaluación de los procedimientos propuestos. La información puede variar según el tipo de valoración empleada. Sin embargo, en la mayoría de los casos una presentación constará de las siguientes secciones.

Justificación - Esta sección debe identificar la necesidad y las ventajas del método propuesto. Para métodos revisados, debe proporcionarse una comparación de las limitaciones del método vigente en los libros oficiales y las ventajas ofrecidas por el método propuesto.

Método analítico propuesto - Esta sección debe contener la descripción completa y suficientemente detallada del método analítico para permitir que personas capacitadas puedan repetirlo. La redacción debe incluir todos los parámetros operativos importantes e indicaciones específicas, como por ej., la preparación de reactivos, las condiciones de aptitud del sistema, descripción de los blancos empleados, precauciones y fórmulas para calcular los resultados.

Datos - Esta sección debe proporcionar documentación detallada y completa de la validación del método, incluyendo datos experimentales y cálculos que fundamenten cada uno de los atributos estudiados.

ATRIBUTOS ANALÍTICOS

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por medio de estudios de laboratorio, que un método es apropiado para el uso propuesto. A continuación se definen cada uno de los atributos necesarios para validar un método analítico junto con una breve descripción de cómo deben determinarse.

Exactitud

Definición - La exactitud de un método analítico es la proximidad entre el resultado obtenido y el valor real. La exactitud debe establecerse en todo el intervalo especificado para el método analítico.

Determinación - En el caso de la valoración de una sustancia, la exactitud puede determinarse por la aplicación del método analítico a una muestra de pureza conocida (como por ej., una *Sustancia de referencia*) o por comparación de los resultados del método analítico propuesto con los de otro método cuya exactitud haya sido establecida.

En el caso de la valoración de una sustancia en un producto farmacéutico, la exactitud puede determinarse mediante la aplicación del método analítico a mezclas preparadas con todos los componentes del producto a l as cuales se les ha agregado cantidades conocidas del analito dentro del intervalo del método.

Si no es posible obtener muestras de todos los componentes del producto, puede ser aceptable agregar cantidades conocidas del analito al producto o comparar los resultados obtenidos con un segundo método cuya exactitud haya sido establecida.

En el caso del análisis cuantitativo de impurezas, la exactitud debe evaluarse sobre muestras (sustancia o producto farmacéutico) a las que se les han agregado cantidades conocidas de impurezas. Si es imposible obtener muestras de las impurezas y/o los productos de degradación, es aceptable comparar los resultados obtenidos por un método independiente (método farmacopeico u otro método analítico validado). En ausencia de otra información, puede ser necesario calcular la cantidad de impureza comparando su respuesta con la respuesta de la sustancia, en estos casos debe emplearse el factor de respuesta si se conoce.

La exactitud debe evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones sobre un mínimo de tres niveles de concentración que cubran el intervalo especificado (como por ej., tres concentraciones/ tres repeticiones completas del método). La exactitud se calcula como el porcentaje de recuperación obtenido a p artir de la valoración de una cantidad agregada conocida de analito en la muestra, o como la diferencia entre la media y el valor aceptado como verdadero junto con los intervalos de confianza.

Precisión

Definición - La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. La precisión de un método analítico, generalmente se expresa como la desviación estándar o desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de mediciones. La precisión puede ser considerada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operativas en

un intervalo de tiempo corto. La precisión intermedia expresa las variaciones intralaboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc. La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos).

Determinación - La precisión de un método analítico se determina mediante el análisis de un número suficiente de alícuotas de una muestra homogénea, lo que permite un cálculo estadísticamente válido de la desviación estándar o la desviación estándar relativa. En este contexto, las valoraciones son análisis independientes que se llevan a cabo siguiendo el procedimiento analítico completo desde la preparación de la muestra hasta el resultado final del ensayo.

La repetibilidad puede evaluarse empleando un mínimo de nueve determinaciones que cubran el intervalo especificado para el método (como por ej., tres concentraciones/tres repeticiones de cada una) o un mínimo de seis determinaciones al 100 % del valor declarado.

Especificidad

Definición - La especificidad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensada por otros procedimientos analíticos.

Para ensayos de identificación esta definición implica asegurar la identidad del analito, para ensayos de pureza implica asegurar que el método permita una exacta determinación del contenido de impurezas, es decir las sustancias relacionadas, límite de metales pesados, límite de impurezas orgánicas volátiles, de productos de degradación, etc. Para valoraciones asegurar un resultado que permita establecer el contenido o pot ent cia del analito en una muestra.

Determinación - En el caso del análisis cualitativo (ensayos de identificación) debe demostrarse la capacidad de discriminar entre sustancias de estructuras estrechamente relacionadas que pudieran estar presentes. La discriminación del método puede ser confirmada mediante la obtención de resultados positivos (como por ej., por comparación con una *Sustancia de referencia*), a partir de muestras que contienen el analito, junto con resultados negativos, a partir de muestras que no contienen el analito. Además, el ensayo de identificación puede aplicarse a materiales estructuralmente parecidos o estrechamente relacionados al analito, para confirmar que no se obtiene una respuesta positiva.

En el caso del análisis de impurezas, la especificidad puede establecerse por el agregado de cantidades apropiadas de impurezas a la sustancia o al producto farmacéutico y demostrando que estas impurezas son determinadas con la precisión y exactitud necesarias.

En el caso de una valoración, se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de impurezas o excipientes. En la práctica, esto puede realizarse agregando, a l a sustancia o al producto farmacéutico, cantidades apropiadas de impurezas o excipientes y demostrando que el resultado de la valoración no se ve afectado por la presencia de estos materiales extraños. Si no se dispone de los productos de degradación o impurezas, la especificidad puede ser demostrada por comparación de los resultados del ensayo con muestras que contienen impurezas o productos de degradación a través de un segundo método independiente (como por ej., métodos farmacopeicos u otro método analítico validado). Estas comparaciones deberían incluir muestras almacenadas bajo condiciones exigentes: luz, calor, humedad, hidrólisis ácido base y oxidación. En el caso de valoraciones los dos resultados deberían compararse. En el caso de ensayos cromatográficos para impurezas deberían compararse los perfiles cromatográficos.

Para métodos cromatográficos instrumentales, deben desarrollarse cromatogramas para demostrar la especificidad. Los ensayos de pureza de pico (como por ej., empleando arreglo de diodos o espectrometría de masa) pueden ser útiles para demostrar que el pico cromatográfico del analito no incluye a otro componente.

Límite de detección

Definición - El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse, en una muestra bajo las condiciones experimentales establecidas.

Determinación - Existen diversas maneras para determinar el límite de detección, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación.

Para métodos no instrumentales, el límite de detección es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser detectado en forma confiable. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una

aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 3:1 ó 2: 1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de detección debería ser luego confirmado por medio del análisis de un núm ero apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de detección propuesto.

Límite de cuantificación

Definición - El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de cuantificación se expresa en las mismas unidades de concentración empleadas para el analito de la muestra.

Determinación - Existen diversas maneras para determinar el límite de cuantificación, dependiendo de que se trate de un método no instrumental o instrumental. Pueden emplearse otras aproximaciones a las presentadas a continuación.

Para métodos no instrumentales, el límite de cuantificación es generalmente determinado por el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito y estableciendo el mínimo nivel al cual el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud. Este procedimiento puede emplearse también para métodos instrumentales.

En el caso de métodos instrumentales que exhiben ruido de fondo, puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación.

Otras aproximaciones se basan en la determinación de la pendiente de la recta de calibración y la desviación estándar de la respuesta.

Cualquiera sea el método empleado, el límite de cuantificación debe ser confirmado por medio del análisis de un número apropiado de muestras con concentraciones cercanas o en el límite de cuantificación propuesto.

Linealidad e intervalo

Linealidad - La linealidad de un método analítico es su capacidad de producir resultados directamente proporcionales a l a concentración de analito dentro de un intervalo dado.

En algunos casos puede ser necesaria la aplicación de transformaciones matemáticas para obtener una recta.

Intervalo - Se refiere al intervalo de concentraciones de analito que pueden ser determinadas con precisión, exactitud y linealidad. Normalmente, el intervalo se expresa con las mismas unidades que los resultados del ensayo.

Determinación de linealidad e intervalo - La linealidad debe establecerse a lo largo del intervalo del método analítico. Se debe establecer por medio de un método estadístico apropiado (como por ej., cálculo de regresión por cuadrados mínimos). En algunos casos, para obtener la proporcionalidad entre los resultados y las concentraciones, los datos deben ser sometidos a una transformación matemática antes del análisis de regresión. Los datos obtenidos a partir de la mejor recta pueden ser útiles para estimar matemáticamente el grado de linealidad. Deben informarse el coeficiente de correlación, la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión.

El intervalo del método es validado al comprobar que el método analítico es preciso, exacto y lineal, cuando es aplicado a muestras que contienen el analito en los extremos del intervalo así como dentro del mismo.

Para establecer la linealidad se deben investigar un mínimo de cinco concentraciones. También se recomienda considerar los siguientes intervalos:

Para la valoración de una sustancia (o un producto farmacéutico): de 80 a 120 % de la concentración de ensayo.

Para la determinación de una impureza: de 50 a 120 % de la especificación.

Para la determinación de uniformidad de contenido: un mínimo de 70 a 130 % de la concentración de ensayo a menos que se justifique otro intervalo de acuerdo a la naturaleza de la forma farmacéutica.

Para ensayos de disolución: ± 20 % del intervalo especificado (como por ej., si la especificación para un producto de liberación prolongada cubre una región de 20 %, después de 1 hora, hasta 90 % luego de 24 horas, el intervalo validado debe ser de 0 a 110 % del valor declarado).

Robustez

Definición - La robustez de un método analítico es una medida de su capacidad de no verse afectado por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad. Ejemplos de variaciones que deben estudiarse durante la

evaluación de la robustez de un método son: diferentes instrumentos, diferentes lotes de reactivos, diferentes tiempos de valoración, diferentes temperaturas de valoración, diferentes columnas cromatográficas (distintos lotes o proveedores), etc. La robustez se expresa normalmente como la falta de influencia de las variables operativas y del entorno sobre los resultados del ensayo.

Determinación - La robustez de un método analítico se determina mediante el análisis de alícuotas a partir de lotes homogéneos empleando condiciones operativas y ambientales diferentes pero que están dentro de los parámetros especificados en la valoración. El grado de reproducibilidad de los resultados del ensayo es luego determinado como una función de las variables de la valoración. Esta reproducibilidad puede compararse con la precisión de la valoración bajo condiciones normales para obtener de una medida de la robustez del método analítico.

DATOS REQUERIDOS PARA LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Los métodos analíticos descritos en esta Farmacopea varían desde determinaciones analíticas complejas hasta la evaluación subjetiva de ciertas características, para los cuales se requieren diferentes esquemas de validación. Las categorías de métodos analíticos más comunes son las siguientes:

CATEGORÍA I - Incluye los métodos analíticos para la cuantificación de los componentes mayoritarios de las materias primas o de los principios activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos.

CATEGORÍA II - Incluye los métodos analíticos empleados para la determinación de impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos. Estos métodos incluyen valoraciones cuantitativas y ensayos límites.

CATEGORÍA III - Incluye métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño (como por ej., disolución, liberación de principios activos).

CATEGORÍA IV - Incluye ensayos de identificación.

Para cada categoría de análisis, se necesita diferente información analítica. En la *Tabla* se indican los elementos que normalmente se requieren para cada una de estas categorías.

Las valoraciones y ensayos generales ya establecidos (por ej., método volumétrico para la determinación de agua, ensayo de endotoxinas bacterianas) deben también validarse para comprobar su exactitud (y ausencia de posibles interferencias) cuando se emplea para un producto o materia prima nuevos.

La validez de un método analítico puede comprobarse sólo mediante estudios de laboratorio. En consecuencia, la documentación que avale tales estudios es un requisito básico para determinar si un método es apropiado para una aplicación determinada. Cualquier método analítico propuesto debe estar acompañado de la documentación necesaria.

Tabla. Datos requeridos para la validación de un método analítico.

Característica	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Cuantitativo	Ensayo límite		
Exactitud	+	+	*	*	–
Precisión					
Repetibilidad	+	+	–	+	–
Precisión Interm.	+	+	–	+	–
Especificidad	+	+	+	*	+
Lím. de detección	–	–	+	*	–
Lím. de de cuantificación	–	+	–	*	–
Linealidad	+	+	–	*	–
Intervalo	+	+	*	*	–

* Puede requerirse según la naturaleza del ensayo.