

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas
Facultad de Química - Farmacia
Departamento de Farmacia



***Tesis en opción al Título Académico de
Licenciado en Ciencias Farmacéuticas***

***Propuesta de una metodología para el desarrollo de
estudios de bioequivalencia in-vitro en la Unidad de
Modelación y Experimentación Biofarmacéutica del
Centro de Bioactivos Químicos***

Autor: Claudia Beatriz Miranda Pérez de Alejo

Tutor (es): Dr.C Miguel Angel Cabrera Pérez

MSc. Yaidel Quiñones García

Santa Clara

2016

Agradecimientos

- *Agradezco de manera especial a mis tutores el Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez y el MSc. Yaidel Quiñones García por todas sus enseñanzas, así como por su dedicación y empeño en la confección de este proyecto.*
- *También agradezco a toda mi familia y amigos por brindarme seguridad y confianza.*
- *A todos los profesores que me acompañaron durante mi vida universitaria por todas las lecciones enseñadas.*

A mi madre, por darme la vida y por ser siempre mi
inspiración.

Resumen

La mayoría de los medicamentos que circulan en Cuba son genéricos o multifuentes, estos fármacos para su dispensación, deben cumplir con estándares de calidad y demostrar equivalencia terapéutica con los productos innovadores, lo que significa similar seguridad y eficacia. Los estudios de bioequivalencia *in vitro* han ganado protagonismo en los últimos 15 años con el surgimiento del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, el cual permite clasificar los fármacos de acuerdo a sus propiedades biofarmacéuticas y bioexonerar de estudios *in vivo* fármacos clasificados como clase I y clase III. Actualmente, el país no cuenta con un laboratorio que desarrolle estudios de bioequivalencia *in vitro*, en ese sentido la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) pretende ofrecer este servicio, en una primera etapa, a las empresas cubanas de genéricos, para lo cual el laboratorio debe estar acreditado asegurando así la confiabilidad de los resultados generados por los estudios. En este trabajo se propone una metodología para una correcta implementación de los estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB del Centro de Bioactivos Químicos. En este sentido se elaboró por vez primera una metodología, basada en las principales regulaciones internacionales y nacionales de demostración de la intercambiabilidad terapéutica de genéricos, para el desarrollo de estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB. La metodología propuesta para el desarrollo de los estudios de bioequivalencia *in vitro* cuenta con 7 etapas técnicas, que facilitarán el flujo de trabajo propuesto y con 16 procedimientos normalizados de operación vinculados a las diferentes etapas descritas, 14 registros de datos primarios, 9 instrucciones de trabajo y 1 protocolo de validación general.

Abstrac

Most drugs circulating in Cuba are generic or multisource, for dispensing these drugs must meet quality standards and demonstrate therapeutic equivalence with innovative products, which means similar safety and efficacy. Studies in vitro bioequivalencia have gained prominence in the last 15 years with the emergence of the Biopharmaceutical Classification System, which classifies drugs according to their biopharmaceutical properties and bioexonerar studies in vivo drugs classified as Class I and Class III. Currently, the country has a laboratory to develop bioequivalence studies in vitro, in that sense Unit Modeling and Experimentation Biopharmaceutical (UMEB) plans to offer this service, in a first stage, the Cuban generic companies for which the laboratory must be accredited ensuring the reliability of the results generated by the studies. This paper presents a methodology for successful implementation of in vitro bioequivalence studies in UMEB Chemical Bioactive Center is proposed. In this sense, first it developed a methodology, based on major international and national regulations demonstration of therapeutic interchangeability of generic, for the development of in vitro bioequivalence studies in UMEB. The proposed methodology for the development of bioequivalence studies in vitro has 7 technical steps that will facilitate the workflow proposed with 16 procedures standard operating procedures related to the different stages described, 14 primary data records 9 work instructions and one general validation protocol.

Índice

Introducción	1
Revisión bibliográfica	4
1.1 Sistema de Gestión de la Calidad en los laboratorios biofarmacéuticos	4
1.2 Biodisponibilidad	8
1.3 Bioequivalencia	9
1.3.1 Estudios de bioequivalencia in-vitro	10
1.4 Bioexención	12
1.5 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	13
1.6 La gestión de la calidad en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica del Centro de Bioactivos Químicos	14
Materiales y métodos	15
2.1 Procedimiento utilizado para elaborar la metodología	15
2.2 Materiales o fuentes consultadas	15
2.2.1 Breve descripción de algunas de las fuentes consultadas	17
2.2.1.1 Nacionales	17
2.2.1.1.1 CECMED	17
2.2.1.1.2 Centro de Bioactivos Químicos (CBQ)	20
2.2.1.2 Internacionales	21
2.2.1.2.1 Organización Internacional de Normalización (ISO)	21
2.2.1.2.2 Agencias Regulatorias	22
2.2.1.2.3 Otras fuentes consultadas	25
Resultados y Discusión	26
3.1 Análisis para la conformación de la documentación general del laboratorio	26
3.2 Funcionamiento interno del laboratorio	27

3.3 Metodología desarrollada para los estudios de bioequivalencia in vitro	28
3.3.1 Etapas del proceso	28
3.3.2 Descripción de las etapas involucradas	29
3.3.2.1 <i>Factibilidad de bioexención</i>	29
3.3.2.2 <i>Protocolo de bioexención</i>	31
3.3.2.3 <i>Recepción de la muestra</i>	32
3.3.2.4 <i>Validación y desarrollo de las técnicas analíticas</i>	32
3.3.2.4.1 Validación	¡Error! Marcador no definido.
3.3.2.4.2 Desarrollo de la técnica	33
3.3.2.5 <i>Análisis estadístico de los resultados</i>	36
3.3.2.6 <i>Elaboración de informes finales</i>	36
3.3.2.7 <i>Almacenamiento de la documentación</i>	37
Conclusiones	38
Recomendaciones	39
Referencias bibliográficas	40
Anexos	44

Introducción

Un gran número de los medicamentos que circulan actualmente en nuestro país son producidos a partir de materias primas importadas. La formulación de un producto farmacéutico basado en estos ingredientes farmacéuticos activos, que ya han vencido sus patentes, son los denominados productos genéricos o multi-fuentes. Estos fármacos, para su dispensación, deben cumplir con estándares de calidad y tienen que demostrar una equivalencia terapéutica con los productos innovadores, lo que significa similar seguridad y eficacia (1).

Tomando en consideración el tiempo que demora poner en el mercado un producto innovador (de 12 a 15 años) y el costo económico en su desarrollo (alrededor de 1000 millones de USD), los medicamentos genéricos han ido ganando un mayor protagonismo dentro del mercado farmacéutico internacional, estimándose que el valor total del mercado de genéricos para el 2016 será de 350 billones de dólares (2-4).

Los estudios de Bioequivalencia *in vivo* han sido el “estándar de oro” aceptado internacionalmente para demostrar la seguridad y eficacia de los medicamentos genéricos. En los últimos 15 años este enfoque ha ido cambiando con la aplicación de un nuevo estándar de clasificación de los fármacos basados en sus propiedades biofarmacéuticas (2, 5-7).

En 1995, con la publicación de los fundamentos para la clasificación biofarmacéutica de fármacos, Amidon y colaboradores sientan las bases de lo que hoy se conoce como el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), acogido y adaptado inicialmente por la FDA (*Food and Drug Administration, USA*) y difundido actualmente en todo el mundo (8). El SCB es un marco científico para clasificar un fármaco considerando su solubilidad acuosa (relativa a la dosis) y su permeabilidad intestinal. La combinación de estas propiedades con la velocidad de disolución del Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA), a partir de formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata, se consideran los tres factores más importantes que modulan la velocidad y cantidad absorbida del fármaco. Una vez clasificado el fármaco es posible establecer si los ensayos de disolución *in vitro* pueden ser sustitutos de las

pruebas de bioequivalencia *in vivo*, que es lo que se conoce como bioexención (9).

En estos momentos la FDA, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), tienen implementado la bioexención basados en el SCB para sustituir los estudios de bioequivalencia *in vivo* para los IFAs de sólidos orales de liberación inmediata, clasificados como clase I (alta solubilidad y alta permeabilidad) y para los clase III (alta solubilidad y baja permeabilidad), siempre y cuando esté científicamente justificado y recomendado (10-12). Estos estudios son de menor costo y de mayor rapidez que los tradicionales ensayos de bioequivalencia *in vivo* (5-7).

Actualmente, el país no cuenta con un laboratorio que desarrolle estudios de bioequivalencia *in vitro* no sólo para demostrar la intercambiabilidad terapéutica de los medicamentos genéricos sino también para potenciar el desarrollo biofarmacéutico de nuevos fármacos. En este sentido, el Centro de Bioactivos Químicos de la UCLV, a través de varios proyectos internacionales, implementó la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) para la aplicación combinada de metodologías biofarmacéuticas *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. En estos momentos la UMEB no es un laboratorio acreditado, lo que puede afectar la fiabilidad y seguridad de los servicios prestados a los clientes e influir negativamente en la confiabilidad de los resultados. La necesidad inmediata de comenzar el proceso de acreditación del laboratorio nos ha permitido identificar como el principal **problema científico** a resolver en una primera etapa la ausencia de protocolos y procedimientos para la correcta implementación de los estudios de bioequivalencia *in vitro*.

En correspondencia con el problema científico planteado, la **hipótesis de la investigación** es la siguiente: Si se identifican las principales etapas para un correcto desarrollo de los estudios de bioequivalencia *in vitro*, y se establecen todos los procedimientos asociados a los diferentes tipos de ensayos, la UMEB podrá comenzar el proceso de acreditación en aras de brindar servicios de calidad y de un alto valor agregado a las empresas farmacéuticas cubanas.

Tomando como base las actuales condiciones del laboratorio, la experiencia de sus investigadores y la relevancia que para el país representa la demostración de la bioequivalencia de sus genéricos, se propone como **objetivo general**:

Proponer una metodología para una correcta implementación de los estudios de bioequivalencia *in vitro* en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica del Centro de Bioactivos Químicos.

Para cumplimentar el objetivo general se proponen como **objetivos específicos** los siguientes:

1. Establecer las diferentes etapas técnicas para el desarrollo de los estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB.
2. Establecer el flujo de procedimientos normalizados de operación para el desarrollo de los estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB.

Revisión bibliográfica

Los análisis de laboratorio son una parte fundamental de los sistemas de gestión, de ahí que los laboratorios que trabajan en éstos campos deben tener controlados desde el momento en que reciben las muestras, luego el proceso de análisis, hasta la entrega de los resultados finales. La necesidad de mejora de la calidad en los laboratorios, unido a la obtención de resultados correctos y fiables, es una demanda diaria de los clientes con el fin de garantizar la calidad y reproducibilidad de los resultados alcanzados. Es por ello que los laboratorios se han visto en la necesidad de implantar un sistema de gestión de la calidad (13).

La norma ISO/IEC 17025 es una norma internacional que constituye la referencia para la acreditación de los laboratorios de ensayo y calibración. Esta norma establece los requisitos generales para la competencia técnica en la realización de los ensayos o calibraciones, incluido el muestreo, ya sean realizadas por métodos normalizados, no normalizados o desarrollados en el laboratorio. Esta norma tiene todos los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayos si desean demostrar que poseen: un sistema de calidad, son técnicamente competentes, capaces de generar resultados técnicamente válidos y poseen un reconocimiento mutuo con otros laboratorios del mundo (14).

Si los laboratorios de ensayos y de calibración cumplen los requisitos de esta norma, actuarán bajo un sistema de gestión de la calidad, cumpliendo a su vez los principios de la Norma ISO 9001. La ISO 17025 cubre requisitos para la competencia técnica que no están incluidos en la ISO 9001 (14).

1.1 Sistema de Gestión de la Calidad en los laboratorios biofarmacéuticos

La industria farmacéutica y biotecnológica es una industria altamente regulada, tanto internacional como nacionalmente. En un mercado cada vez más competitivo, la calidad es un factor estratégico imprescindible. Hoy en día, son cada vez más las empresas y organismo que exigen a sus proveedores demostrar la calidad certificada por alguna de las normas o estándares existentes. En nuestro caso el país se rige de acuerdo a las normas emitidas por la Oficina Nacional de Normalización (15).

Desde el punto de vista del desarrollo de medicamentos existen diferentes agencias regulatorias internacionales que aplican regulaciones específicas para garantizar la calidad y reproducibilidad en las diferentes etapas de investigación, desarrollo y producción del medicamento. Entre las principales agencias regulatorias, que marcan las pautas a nivel internacional se destacan: la *Administración de Fármacos y Alimentos* de los Estados Unidos (FDA), la *Agencia Europea de Medicamentos* (EMA) y la *Asociación de Naciones del Sudeste Asiático* (ASEAN). Otras de las entidades con una gran importancia en las regulaciones relativas al medicamento son la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) y la *Conferencia Internacional sobre Armonización* (ICH). En Cuba la agencia regulatoria es el *Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos* (CECMED) (16, 17).

Con relación a la calidad de los laboratorios de investigación, el CECMED exige el cumplimiento de las *Buenas Prácticas de Laboratorio* (BPL), las cuales se refieren al conjunto de requisitos científicos, técnicos, y de sentido común para la administración de los laboratorios, tanto en lo referido a los aspectos de dirección como para la ejecución de sus actividades, con vista a garantizar la calidad y confiabilidad de sus resultados. Específicamente las Regulaciones No. 39/2004. *Principios de las buenas prácticas de laboratorio no clínico de seguridad sanitaria y medio ambiental* y la No. 37/2012. *Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos*, son las principales normativas establecidas para implementar el sistema de gestión de la calidad y demostrar la confiabilidad de los resultados de ensayos obtenidos (1, 16, 18).

El ámbito regulador para el desarrollo de medicamentos incluye además normas específicas para cada tipo de ensayo. Para los estudios biofarmacéuticos se describen en la literatura varias regulaciones establecidas por las agencias reguladoras internacionales del sector, así como por el CECMED (ver Tabla 1).

Ensayo \ Agencia Regulatoria	FDA	EMA	OMS	CECMED
Disolución	<p>Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms (FDA, 1997)</p> <p>Dissolution Testing and Specification Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms containing Biopharmaceutics Classification System Class 1 and 3 Drugs Guidance for Industry (Draft Guidance, 2015)</p>	<p>Guideline on the investigation of bioequivalence (Appendix I) (Doc.Ref: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev.1, 2010)</p>		<p>Requisitos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata (Reg. No. 48/2007)</p>
Validación de métodos analíticos	<p>Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. (Draft Guidance, 2014)</p>			<p>Validación de métodos analíticos (Anexo No.1 Regulación 37) (Reg. No. 41/2007)</p>

<p>Biodisponibilidad y Bioequivalencia</p>	<p>Average, Population, and Individual Approaches to Establishing Bioequivalence (FDA, 1999).</p> <p>Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDAs or INDs — General Considerations (Draft Guidance 2014)</p> <p>Bioequivalence Studies with Pharmacokinetic Endpoints for Drugs Submitted Under an ANDA (Draft Guidance 2013)</p>	<p>Guideline on the investigation of bioequivalence (Appendix II) (Doc. Ref: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev.1, 2010)</p>		<p>Requerimientos para estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia (Reg. No. 18/2007)</p>
<p>Intercambiabilidad</p>	<p>Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate- Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System: guidance for industry (FDA, 2015)</p>	<p>Guideline on the investigation of bioequivalence (Appendix III) (Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1, 2010)</p>	<p>Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO 2015.</p>	<p>Requerimientos de la demostración de intercambiabilidad terapéutica para el registro de los productos farmacéuticos multiorigen (Req ITPFMO)</p>

Como puede apreciarse en la Tabla 1, se reconoce la potencialidad del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) para demostrar la intercambiabilidad terapéutica de formas sólidas orales (tabletas y cápsulas) de liberación inmediata, mediante ensayos de disolución *in vitro* (bioequivalencia *in vitro*). Los laboratorios con capacidad para realizar estos estudios deben seguir las buenas prácticas de laboratorio, con el objetivo de garantizar la calidad y la reproducibilidad de los resultados alcanzados. Las potencialidades de desarrollo de este tipo de ensayos juegan un papel fundamental para el desarrollo de genéricos en el país (6).

Para alcanzar un completo entendimiento de las diversas regulaciones establecidas por las principales agencias regulatorias del medicamento y especialmente por el CECMED, una serie de conceptos biofarmacéuticos deben ser conocidos. A continuación serán descritos en detalle.

1.2 Biodisponibilidad

La biodisponibilidad se refiere a la velocidad y cantidad en que un fármaco es absorbido a partir de una forma farmacéutica para alcanzar la circulación sistémica (19).

La biodisponibilidad absoluta de un medicamento es una medida de la eficacia de la vía de administración. La vía intravenosa es la referencia absoluta ya que cuando se administra un fármaco por esta vía, ingresa a la circulación sistémica el 100% de la dosis. Por lo tanto, para evaluar la biodisponibilidad absoluta se debe administrar el mismo principio activo primero en una forma farmacéutica de uso intravenoso y luego en otra forma farmacéutica preparada para administrar por la vía en estudio. En cambio, la biodisponibilidad relativa es aquella en la que se compara la biodisponibilidad de un fármaco administrado en la forma farmacéutica de prueba con la del mismo fármaco administrado mediante la forma farmacéutica convencional. Por lo tanto, la biodisponibilidad relativa es una medida de la eficacia de la absorción de un mismo principio activo desde dos formas farmacéuticas similares (11, 19).

Varios son los factores que influyen directa o indirectamente en la biodisponibilidad de un principio activo: i)- el tipo de forma farmacéutica y los excipientes utilizados, los cuáles deben permitir la liberación eficiente del ingrediente farmacéutico activo desde la forma farmacéutica que lo contiene, su posterior disolución en las condiciones fisiológicas y su permeabilidad a través de la barrera gastrointestinal, para finalmente alcanzar la circulación sistémica; ii)- el mecanismo de absorción, que se refiere a como el principio activo es transportado desde el lumen hacia la circulación sistémica a través de los diferentes tipos de transporte; iii)- las características propias del sistema gastrointestinal y el tiempo de tránsito que varía desde la ingesta de la forma farmacéutica hasta su eliminación; iv)- las características fisicoquímicas del fármaco que afectan la absorción, como el coeficiente de partición, constantes de disociación, pH, pKa, etc; y v)- la eliminación pre-sistémica a nivel intestinal y hepático las cuales pueden disminuir la biodisponibilidad de ciertos fármacos impidiendo en un cierto grado la absorción del principio activo (11, 20, 21).

1.3 Bioequivalencia

Se dice que dos o más productos son bioequivalentes si sus biodisponibilidades no difieren significativamente cuando se administra la misma dosis en condiciones experimentales similares. Por tanto, los productos farmacéuticos se consideran bioequivalentes si el producto farmacéutico en estudio no muestra una diferencia significativa en la velocidad y grado de absorción en comparación con un producto farmacéutico designado como referencia, cuando se administran a la misma dosis molar de la misma entidad activa, en la misma forma farmacéutica y bajo condiciones experimentales similares, bien sea en dosis únicas o en dosis múltiples (22).

El objetivo de un estudio de bioequivalencia es demostrar que dos productos farmacéuticos producen concentraciones suficientemente similares para concluir que el efecto sistémico de ambos es el mismo (23).

El diseño de un estudio de bioequivalencia depende de los objetivos del mismo, la capacidad de analizar el fármaco en fluidos biológicos, la

farmacodinámica del fármaco, la vía de administración del medicamento, la naturaleza del fármaco y del producto farmacéutico (22).

Dentro de este contexto, los productos farmacéuticos se pueden clasificar de la siguiente manera:

Equivalentes Farmacéuticos: Son productos farmacéuticos que contienen idénticas cantidades de los mismos principios activos, o sus mismas sales o ésteres, en idéntica forma farmacéutica y vía de administración, pero no necesariamente contienen los mismos excipientes, y que cumplen con las mismas o comparables especificaciones de calidad. Los Equivalentes Farmacéuticos no necesariamente implican Bioequivalencia ya que diferencias en los excipientes y/o procesos de manufactura pueden conducir a una rápida o lenta disolución y/o absorción (23).

Equivalentes Terapéuticos: Dos productos farmacéuticos son Equivalentes Terapéuticos si son Equivalentes Farmacéuticos y, después de la administración en la misma dosis molar, sus efectos, con respecto a eficacia y seguridad, son esencialmente los mismos, determinados por estudios apropiados (clínicos, farmacodinámicos, de bioequivalencia, o "*in vitro*").

En la práctica, la demostración de bioequivalencia es generalmente el método más apropiado de acreditar la Equivalencia Terapéutica entre productos farmacéuticos que son Equivalentes Farmacéuticos, siempre y cuando ellos no tengan excipientes que vayan a afectar la seguridad o la eficacia (17).

Alternativas Farmacéuticas: Los productos farmacéuticos son Alternativas Farmacéuticas si ellos contienen idénticas cantidades de los mismos principios activos, pero difieren en su forma farmacéutica o en su forma química. Las Alternativas Farmacéuticas entregan la misma fracción activa por la misma ruta de administración pero no son Equivalentes Farmacéuticos.

1.3.1 Estudios de bioequivalencia *in-vitro*

Los estudios de bioequivalencia *in vivo* se iniciaron en 1977, cuando la FDA solicitó determinaciones farmacocinéticas para bioequivalencia, a través de la

medición del área bajo la curva (AUC) y la concentración sistémica máxima (C.máx.), para genéricos de digoxina, fenitoína, antidepresivos tricíclicos e hipoglicemiantes orales que habían presentado problemas de eficacia (24).

Los estudios de bioequivalencia *in vivo* han sido el “estándar de oro” aceptado internacionalmente para demostrar la seguridad y eficacia de los medicamentos. Sin embargo, con el surgimiento y aplicación del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) se ha demostrado la intercambiabilidad terapéutica de aquellos medicamentos que pertenecen a la Clase I (alta solubilidad y alta permeabilidad) y III (alta solubilidad y baja permeabilidad) del SCB, a través de un ensayo de velocidad de disolución. Estos estudios son de menor costo y de mayor rapidez que los tradicionales ensayos de bioequivalencia *in vivo* (2, 5, 7).

La utilización de los estudios *in vitro* (ensayos de velocidad de disolución) se basan en el hecho de que luego de la administración de un medicamento por vía oral desde una forma farmacéutica sólida, la absorción del principio activo depende de los procesos de liberación, disolución y permeabilidad a través de la barrera gastrointestinal (25). Varias evidencias indican que las diferencias observadas *in vivo* entre la velocidad y la cuantía de la absorción de un principio activo en dos productos farmacéuticos orales sólidos (Equivalentes Farmacéuticos o Alternativas Farmacéuticas) pueden ser atribuibles a diferencias en la cinética de liberación-disolución del fármaco *in vivo*. Sin embargo, cuando la liberación-disolución *in vivo* de una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata es rápida con relación al vaciamiento gástrico y el principio activo tiene una alta permeabilidad, es poco probable que la velocidad y la cuantía de la absorción del fármaco dependan de la liberación-disolución y/o el tiempo de tránsito gastrointestinal del fármaco. Bajo tales circunstancias, es posible que no sea necesaria la demostración de la bioequivalencia *in vivo* para los productos farmacéuticos que contienen ingredientes farmacéuticos activos que pertenecen a la Clase I, siempre que los excipientes usados en la forma farmacéutica y el proceso de fabricación no afecten significativamente la absorción de los ingredientes farmacéuticos activos (25, 26).

Un estudio de bioequivalencia *in vitro* es una prueba de disolución que incluye la comparación del perfil de disolución entre el producto de estudio y el producto de referencia en tres medios: a pH 1,2, pH 4,5 y pH 6,8 (12).

Para la realización de un estudio de bioequivalencia, es necesario contar con un producto farmacéutico de referencia, que generalmente es el producto innovador, y el producto farmacéutico en estudio. Ambos son definidos de la siguiente manera:

Producto de Referencia o Innovador: El producto de referencia es un producto farmacéutico con el que el producto en estudio está destinado a ser intercambiable en la práctica clínica. Normalmente se corresponde al producto innovador ya que su eficacia, seguridad y calidad han sido establecidas.

Producto Farmacéutico en estudio: Producto farmacéutico que es sometido a una investigación sistemática para determinar su equivalencia terapéutica con respecto al producto de referencia, mediante estudios apropiados.

1.4 Bioexención

Es la prerrogativa de la autoridad regulatoria para eximir de la obligación de tener que presentar estudios de bioequivalencia *in vivo* (ensayo clínico en humanos) para el establecimiento de la equivalencia terapéutica, la cual puede demostrarse mediante estudios *in vitro*. Para formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata, la evidencia de bioequivalencia se determina basándose en una comparación del perfil de disolución *in vitro* entre el producto en estudio y el producto de referencia, siempre y cuando el ingrediente farmacéutico activo tenga adecuados valores de solubilidad y permeabilidad intestinal (22, 27).

Una de las mayores ventajas del procedimiento de bioexención es la simplificación y reducción del tiempo requerido para la aprobación del producto, reduciendo así los costos de llevar un producto bioequivalente al mercado (27).

1.5 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) es un marco científico utilizado para clasificar los principios activos basándose en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal. Cuando se combina con la cinética de liberación-disolución del producto farmacéutico, el SCB considera tres factores principales que gobiernan la velocidad y cuantía de la absorción a partir de formas farmacéuticas de liberación inmediata: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal (20).

De acuerdo al SCB, los principios activos se clasifican de la siguiente manera:

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
I	Alta	Alta
II	Baja	Alta
III	Alta	Baja
IV	Baja	Baja

Esta clasificación puede ser usada para el marco de las especificaciones de la disolución *in vitro* y puede también proveer un base para predecir la probabilidad de obtener una correlación *in vivo* – *in vitro* (IVIVC) satisfactoria (20).

El uso del SCB se ha convertido en un medio para documentar la bioequivalencia sin efectuar un estudio *in vivo* (6, 22). Para clasificar un producto farmacéutico acorde al SCB, la solubilidad, dosis y permeabilidad del fármaco deben ser conocidas (28). Para ingredientes farmacéuticos, en formas sólidas orales de liberación inmediata, con alta solubilidad y alta o baja permeabilidad, la documentación de bioequivalencia usando una aproximación *in vitro* (SCB) es apropiada (11).

De acuerdo a la norma de equivalencia terapéutica vigente en Cuba, el principio activo de un producto farmacéutico para el cual se solicita una exención de un estudio de biodisponibilidad *in vivo*, basándose en el SCB deberá ser altamente soluble y altamente permeable (Clase I) o tener alta solubilidad y baja

permeabilidad (Clase III). Además, se debe tener en cuenta algunas consideraciones adicionales, como los excipientes utilizados y la ventana terapéutica del fármaco. Los excipientes utilizados en el producto en estudio, no deben afectar la velocidad y magnitud de la absorción. Por otro lado, los fármacos que tienen un estrecho margen terapéutico no son considerados para una demostración de la Bioequivalencia basada en el SCB (22, 26, 29).

1.6 La gestión de la calidad en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica del Centro de Bioactivos Químicos

La Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) desarrolla estudios biofarmacéuticos *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo* como herramientas de predicción para disminuir la experimentación en seres humanos, brinda servicios científico-técnicos y se erige como unidad docente en la prestación de servicios académicos como cursos, asesoramiento de tesis de grado, maestría y doctorado. Uno de los servicios de mayor relevancia e impacto a ofrecer a muy corto plazo son los vinculados al desarrollo de bioequivalencia *in vitro*. Sin embargo para ello se deben cumplir las buenas prácticas de laboratorio y los requisitos establecidos por las agencias regulatorias para el tipo de ensayo.

El CBQ posee un Sistema Integrado de Gestión de la Calidad ISO-Buenas Prácticas de Fabricación Farmacéutica, pero este sistema no tiene alcance a las procesos de investigación y prestación de servicios científico técnicos por lo cual el primer paso de la UMEB es establecer las bases para una adecuada gestión de la calidad en el laboratorio, con el fin de brindar resultados confiables. Un adecuado diagnóstico basado en un sistema de gestión de la calidad que cumpla con los requisitos de la NC ISO 17025: 2006, y las Regulaciones No. 39/ 2004 y la 37/2012 sería el inicio para alcanzar la meta trazada.

Materiales y métodos

2.1 Procedimiento utilizado para elaborar la metodología

El procedimiento utilizado para la confección y elaboración de una metodología, con el objetivo de emplearla en el desarrollo y acreditación de los Estudios de Bioequivalencia in vitro, en La Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica, fue el siguiente:

- Se llevó a cabo una **revisión de la legislación nacional e internacional vigente** sobre el tema de bioequivalencia, además fueron revisados artículos, documentos, etc., que tuvieran relacionados con el tema; se consultaron diversas fuentes en Internet, así como algunos documentos impresos existentes en el Departamento de Control de la Calidad del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ). Las fuentes consultadas para la realización de este trabajo estuvieron relacionadas con temáticas tales como Bioequivalencia, Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), Gestión de Calidad, Validación de técnicas analíticas, Confección y codificación de procedimientos, protocolos e instrucciones de trabajo, etc.
- Después de revisadas todas las regulaciones, normas y documentos anteriores, se **organizaron las etapas a seguir** (etapas del proceso), de esta manera se elaboró una propuesta de organigrama para desarrollar en el laboratorio.
- Una vez determinadas las etapas para el desarrollo de los estudios de bioequivalencia, **se diseñaron y elaboraron una serie de documentos** (Procedimientos, Registros, Instrucciones de trabajo, etc.) vinculados a cada una de las etapas del proceso logrando un desempeño con calidad de sus funciones y cumpliendo así con las BPL.

2.2 Materiales o fuentes consultadas

Las fuentes consultadas para la realización de este trabajo fueron: regulaciones emitidas por el Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), la Organización Internacional de

Normalización (ISO), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) y las Agencias Regulatorias de Brasil (ANVISA), Argentina (ANIMAT) y Chile (ISP). Especialmente se tomó en consideración para la elaboración de la metodología de trabajo propuesta, los requerimientos de Chile, país que ha tenido un amplio desarrollo en este campo. También se revisaron los procedimientos aprobados por el Departamento de Aseguramiento de la Calidad del Centro de Bioactivos Químicos.

El análisis que se hizo con las fuentes consultadas para la confección e implementación de la metodología para los Estudios de Bioequivalencia, se realizó de la siguiente manera (Ver Figura 3.1):

- Se adecuó la legislación internacional vigente a nuestras condiciones y particularidades.
- La documentación que se elaboró cumplió con lo establecido en la legislación nacional
- Se confeccionó toda la metodología según los procedimientos establecidos por el Centro de Bioactivos Químicos.

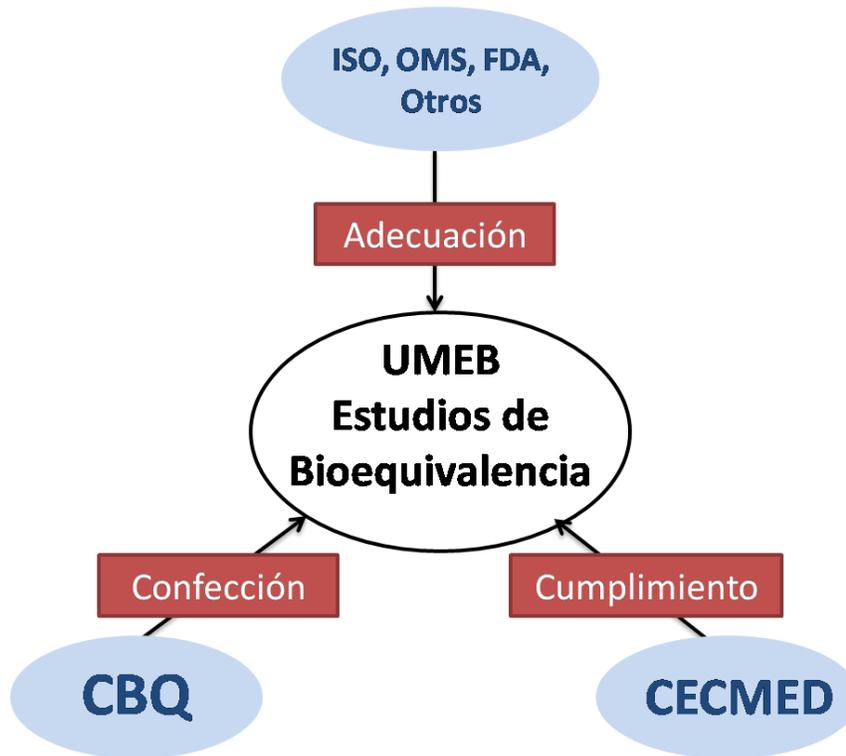


Figura 3.1 *Análisis realizado con las fuentes consultadas en la confección de la metodología deseada para los estudios de bioequivalencia.*

2.2.1 Breve descripción de algunas de las fuentes consultadas

2.2.1.1 Nacionales

2.2.1.1.1 CECMED

- ❖ Regulación No. 61/2012. “Requisitos para el registro sanitario de medicamentos de uso humano”

Señala la obligatoriedad de la inscripción de los medicamentos en el Registro para poder circular en el país y establece que para formular las solicitudes de Inscripción, Renovación y Modificación deben cumplimentarse los requisitos vigentes. Establece que para determinados medicamentos multifuentes se requiere demostrar equivalencia terapéutica, de acuerdo a lo establecido en las regulaciones de intercambiabilidad terapéutica y de biodisponibilidad y bioequivalencia.

- ❖ Resolución 41/2005. “Requerimientos de la demostración de la intercambiabilidad terapéutica para el registro de productos farmacéuticos multiorigen”.

Esta regulación tiene como objetivo suministrar una guía técnica para las Agencias Reguladoras de Medicamento y para los productores de medicamentos y alertar sobre el hecho de que en ciertos casos, los fallos en el aseguramiento de la intercambiabilidad pueden ocasionar perjuicios a la salud y la seguridad de los pacientes. Es aplicable a los productos que se fabrican por diferentes fabricantes y que incluyen el mismo principio activo en la misma dosis. No se aplica para los productos biológicos, biotecnológicos ni de alta tecnología (vacunas y hemoderivados), debido a que para los mismos la intercambiabilidad se establece sobre otro tipo de consideraciones. Establece los requerimientos de la documentación de registro para los productos farmacéuticos multifuentes, cuando se requieren los estudios de bioequivalencia y que tipo de estudio realizar.

- ❖ Regulación. No. 18/ 2007. “Requerimientos para estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia”.

Esta regulación actualiza la Regulación 18/99: Requerimientos para estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia. Establece los aspectos fundamentales para definir la realización de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, atendiendo a la novedad y categoría de los medicamentos según se clasifican en los Requisitos para la Solicitud de Inscripción, Renovación y Modificación en el Registro de Medicamentos de Uso Humano vigentes e incluye una “Guía para la Confección del Protocolo de los Estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia” que contiene los aspectos prácticos y metodológicos que deben considerarse durante la planificación de un ensayo, conforme a lo establecido en las Buenas Prácticas Clínicas vigentes en el país.

- ❖ Regulación No. 48/ 2007. “Requisitos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata”.

Emitida en el año 2007, establece los requisitos que deben tenerse en cuenta al diseñar un ensayo de disolución, proporciona información acerca de la

metodología requerida para comparar los perfiles de disolución y es aplicable a todas las tabletas, tabletas revestidas, cápsulas duras y blandas de liberación inmediata cuyo IFA sea de acción sistémica.

- ❖ Regulación No. 39/ 2004. “Principios de las buenas prácticas de laboratorio no clínico de seguridad sanitaria y medio ambiental”.

Se regulan los principios de las buenas prácticas de laboratorio teniendo como objetivo promover la calidad de los datos de los estudios no clínicos que están destinados a las Agencias Reguladoras. Estos principios son una serie de criterios que deben ser cumplimentados para asegurar la calidad e integridad de los estudios, el reporte de conclusiones verificables y la trazabilidad de los datos, aspectos relevantes para el reconocimiento y la aceptación mutua de resultados. Esta regulación es aplicable a los ensayos no clínicos: cinéticos y de seguridad sobre sustancias de ensayo contenidas en productos farmacéuticos de uso humano, equipos médicos para implantes y biomateriales, desinfectantes, plaguicidas, cosméticos, medicamentos veterinarios, aditivos utilizados en la alimentación humana y animal, y sustancias químicas industriales.

- ❖ Regulación No. 37/ 2012. “Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos”.

Resolución emitida por el CECMED en el año 2012 tiene como objetivo principal proveer pautas o requisitos para alcanzar el adecuado desempeño de los Laboratorios para el Control de Medicamentos, con vistas a garantizar el cumplimiento de las especificaciones de calidad de materias primas, productos intermedios y productos terminados. La aplicación de ese documento es de obligatorio cumplimiento para implementar un sistema de Gestión de la Calidad para demostrar la confiabilidad de los resultados de ensayos obtenidos. Se incluyen aspectos de la ISO/IEC 17025: 2006. Los requisitos de esta Regulación pueden ser aplicables a laboratorios de investigación que participen en el desarrollo de medicamentos.

- ❖ Anexo No.1 Regulación 37. “Validación de métodos analíticos”.

Es una regulación emitida por el CECMED en el año 2012 donde se establecen las normas a cumplir en la realización de cualquier proceso de validación, tales como: situaciones en los cuales se exige la realización de una validación, ya sea exhaustiva o no, características principales que debe cumplir un protocolo de validación, parámetros fundamentales a evaluar según sea el caso y formas de evaluación de estos, validación de los parámetros intrínsecos del ensayo de disolución, así como toda la documentación de los resultados del proceso.

2.2.1.1.2 Centro de Bioactivos Químicos (CBQ)

- ❖ PNO D.001/2015 “Metodología para la elaboración y revisión de los PNO e Instrucciones de Trabajo”.

Establece las reglas para la elaboración y revisión de los PNO e Instrucciones de Trabajo, tales como: personas responsables de su elaboración, elementos de identificación, estructura del PNO y los elementos que son o no obligatorios.

- ❖ PNO D.002/2015 “Metodología para la codificación de los PNO, Instrucciones de Trabajo y Registros”.

Establece la metodología para la codificación de los PNO, Instrucciones de Trabajo y Registros, indicando cuales son los códigos, establecidos por el centro, para cada proceso.

- ❖ PNO I.G.001/2013 “Metodología para la confección de los protocolos de investigación”.

Tiene como objetivo establecer la metodología para la confección de los protocolos de investigación o planes de estudio en correspondencia con la regulación 39/2004 “Buenas prácticas de laboratorio no clínico de seguridad sanitaria y medio ambiental” (BPL).

- ❖ PNO M.01.003/12-05-15 “Redacción, revisión y aprobación del Protocolo de Validación de Método de Ensayo”.

Este procedimiento tiene como objetivo establecer los elementos de identificación, la estructura y los elementos de edición recomendados de un protocolo de validación de método de ensayo, así las características de su revisión y aprobación.

- ❖ PNO M.01.005/12-05-15 “Redacción, revisión y aprobación del Informe de Validación”.

Establece la metodología adecuada para la redacción, revisión y aprobación del Informe de Validación, teniendo en cuenta el PNO M.01.003/12-05-15.

- ❖ PNO I.G.002 Confección de informes finales.

Este procedimiento tiene como objetivo establecer la metodología para la elaboración del Informe de los resultados del Ensayo no clínico, en correspondencia con la regulación No. 39/2004 “Buenas prácticas de laboratorio no clínico de seguridad sanitaria y medio ambiental” y la NC/ISO/IEC 1725: 2006 “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”.

- ❖ PNO D.004 Conservación, modificación y derogación de la documentación del SGI del CBQ.

Este documento establece los principios generales para la conservación, modificación y derogación de toda la documentación del Sistema de Gestión Integrado del CBQ.

2.2.1.2 Internacionales

2.2.1.2.1 Organización Internacional de Normalización (ISO)

- ❖ NC-ISO/IEC 17025:2006. “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración”.

Esta Norma Internacional establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos o de calibraciones. Cubre los ensayos y las calibraciones que se realizan utilizando métodos normalizados, métodos no

normalizados y métodos desarrollados por el propio laboratorio. Establece las condiciones que debe tener el laboratorio, las características de la documentación, del personal, todos los procedimientos normalizados de operación que deben existir y todo lo relacionado con métodos de validación.

- ❖ Norma ISO 9001:2008. “Sistemas de gestión de la calidad – Requisitos”.

Se centra en todos los elementos de administración de calidad con los que una empresa debe contar para tener un sistema efectivo que le permita administrar y mejorar la calidad de sus productos o servicios.

2.2.1.2.2 Agencias Regulatorias

Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA)

- ❖ Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para productos farmacéuticos administrados oralmente - Consideraciones generales. Guía para la industria. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Centro de administración de medicamentos para la Evaluación e Investigación de Fármacos (CDER) de la Alimentación. Octubre 2000.

Esta guía recoge las recomendaciones con respecto al diseño del estudio y el desarrollo de métodos de disolución, la comparación de las medidas de BA, la definición de proporcionalidad, y la exención para los estudios de bioequivalencia. Estas revisiones proporcionan una orientación clara de la realización de estudios de BE para productos farmacéuticos administrados por vía oral.

- ❖ Bioexención a la biodisponibilidad *in vivo* y estudios de bioequivalencia para formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediatas basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica. Guía para la industria Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Centro de administración de medicamentos para la Evaluación e Investigación de Fármacos (CDER) de la Alimentación. Mayo 2015.

Esta guía proporciona recomendaciones para la investigación de nuevas aplicaciones de fármacos, nuevos medicamentos de formas de dosificación oral sólida y que deseen solicitar una exención de los estudios de bioequivalencia *in*

vivo. Constituye una actualización de la guía para la industria publicada en agosto del 2000 y explica cuando pueden ser solicitadas bioexenciones para formas farmacéuticas solidas de liberación inmediata sobre el enfoque del SCB. Incluye la posibilidad de bioexención a productos clasificados como Clase III.

- ❖ Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia enviados en NDAs o INDs - Consideraciones generales. Guía para la industria. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU. Centro de administración de medicamentos para la Evaluación e Investigación de Fármacos (CDER) de la Alimentación. Marzo 2014.

El propósito de esta guía es proveer recomendaciones a los solicitantes que deseen incluir información de biodisponibilidad (BA) y bioequivalencia (BE) para productos farmacéuticos administrados oralmente en las solicitudes de fármacos nuevos en fase de investigación clínica, solicitudes de autorización de fármacos, solicitudes de autorización abreviadas de fármacos nuevos y sus suplementos. Esta guía se enfoca en cómo cumplir los requisitos de BA y BE aplicados para las formulaciones farmacéuticas indicadas para administración oral.

Agencia Europea de Medicamentos (EMA)

- ❖ Lineamientos para la investigación de bioequivalencia. Comité para productos médicos de uso humano. Enero del 2010.

Esta guía especifica los requisitos para el diseño, la realización y la evaluación de los estudios de bioequivalencia para las formas sólidas de liberación inmediata con acción sistémica. Establece los criterios pertinentes en las que no es posible exigir estudios de biodisponibilidad y brinda recomendaciones específicas con respecto a los estudios de bioequivalencia para productos de liberación modificada, productos transdérmicos y productos inhalados por vía oral.

Instituto de Salud Pública de Chile (ISP)

- ❖ "Norma que define los criterios para establecer Equivalencia Terapéutica (EQT) a productos farmacéuticos en Chile" (Res. Ex. 727/05, Publicado en el diario oficial en Nov. 29, 2005)
- ❖ "Listados de Principios activos contenidos en productos farmacéuticos que deben establecer Equivalencia Terapéutica mediante estudios in vivo o in vitro" (Res. Ex.726/05, publicado en el Periódico Nacional en Nov 29, 2005).
- ❖ Guía técnica in vivo: G-BIOF 01: "Estudios de biodisponibilidad comparativa con producto de referencia para establecer equivalencia terapéutica" y guía in vitro GBIOF 02: "Bioexención de los estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia para establecer equivalencia terapéutica de formas farmacéuticas sólidas orales", ambas oficializadas mediante resolución exenta 4886/08.
- ❖ ISP Formulario F-BIOF 01: Solicitud de autorización de centros para realizar estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia terapéutica de medicamentos
- ❖ Formulario F-BIOF 02: Solicitud de autorización de protocolo para realizar estudio de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica (EQT)
- ❖ Formulario F-BIOF 03: Presentación de resultados de estudio de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica
- ❖ Anexo I F-BIOF-03: Planilla resumen de resultados del estudio de bioequivalencia
- ❖ ISP Formulario F-BIO 04 Solicitud de autorización de centros biofarmacéuticos para realizar estudios in vitro para optar a una bioexención.
- ❖ ISP Formulario F-BIO 05 Solicitud de autorización de protocolo de estudios in vitro para optar a bioexención de estudios de BE in vivo para demostrar equivalencia terapéutica.

- ❖ ISP Formulario F-BIO 06 Presentación de resultados de estudios in vitro para optar a bioexención de estudios de BE in vivo para demostrar equivalencia terapéutica (EQT).

2.2.1.2.3 Otras fuentes consultadas

Organización Mundial de la Salud (OMS)

- ❖ Productos farmacéuticos multifuentes (genéricos): regulaciones sobre los requerimientos de registro para establecer intercambiabilidad. Comité de Expertos de la OMS en Especificaciones para las Preparaciones Farmacéuticas (Anexo 7). Reporte técnico de la OMS, Serie No.992 del 2015.

La guía proporciona requisitos para asegurar la intercambiabilidad del producto farmacéutico sin comprometer la seguridad, calidad y eficacia del producto.

Resultados y Discusión

3.1 Análisis para la conformación de la documentación general del laboratorio

En la Figura 3.1 se muestra un diagrama general que evidencia la relación existente entre las temáticas fundamentales abordadas y las fuentes consultadas, respectivamente. Teniendo en cuenta esta relación se analizó la documentación relacionada con el *Funcionamiento Interno del Laboratorio* a partir de aquí se definieron las actividades a realizar por el mismo. A los efectos de este trabajo y para comprender mejor el análisis realizado, las actividades que se desarrollan en el Laboratorio se dividieron en dos grupos, *Estudios de Bioequivalencia in vitro* y *Otros Servicios (ensayos generales farmacocinéticos y biofarmacéuticos)*, lo cual ayudará a una mejor comprensión, definición y elaboración de los procedimientos, protocolos, etc., relacionados con una u otra actividad.

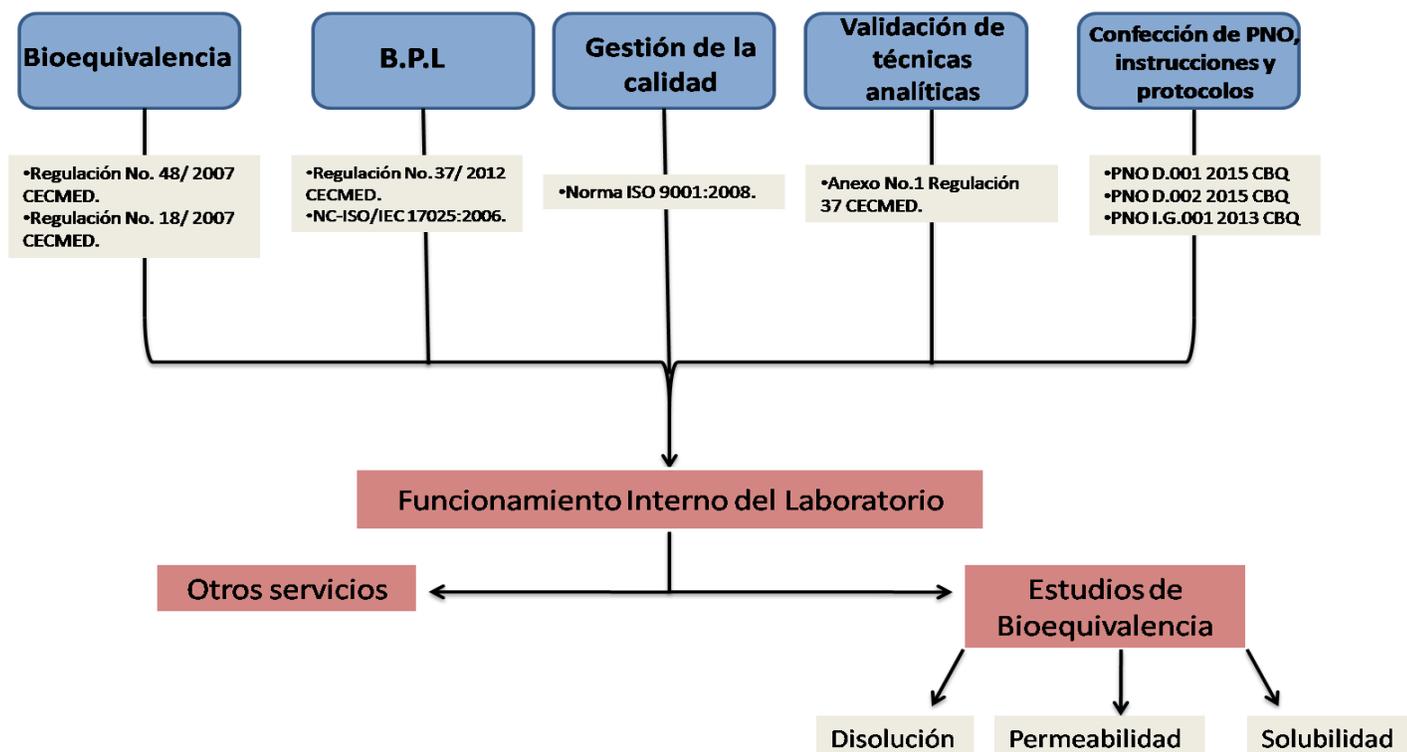


Figura 3.1 Relación entre las temáticas consultadas y las principales fuentes utilizadas para conformar toda la documentación del Laboratorio.

3.2 Funcionamiento interno del laboratorio

Para garantizar la calidad y confiabilidad de sus resultados, según las BPL, es esencial que la UMEB posea un Manual de Laboratorio (Figura 3.2), que incluye la política del laboratorio, los procedimientos, los protocolos, los registros, las instrucciones de trabajo, etc., con el objetivo de garantizar:

- La confidencialidad de la información que genera el Laboratorio.
- La transferencia de los resultados y registros analíticos.
- La protección de los documentos (papel y electrónicos).
- La completa trazabilidad en todos los pasos de los procesos que se desarrollen.
- El tratamiento de resultados fuera de especificaciones, obtenidos durante la ejecución de los ensayos (13, 15, 18).

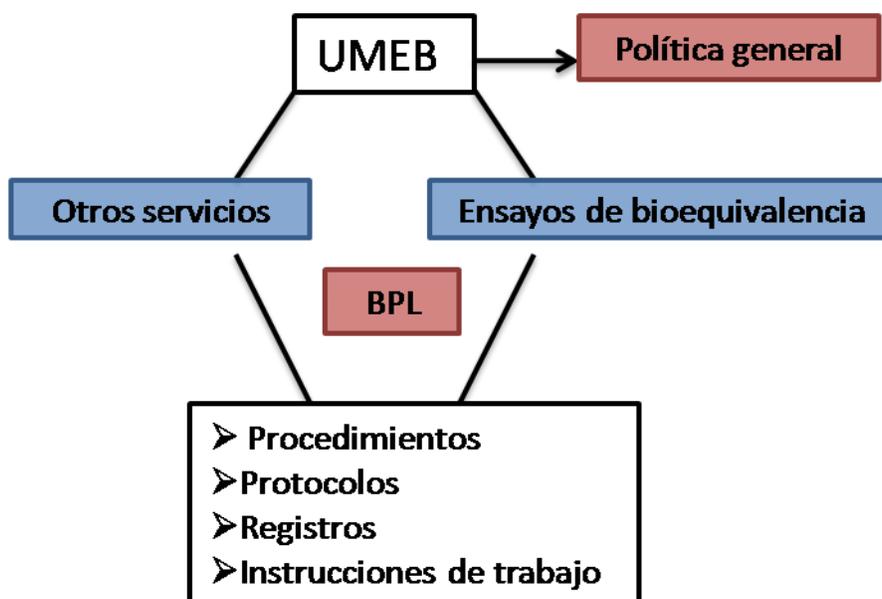


Figura 3.2 *Manual del Laboratorio*

En este sentido, la UMEB ya tiene registrados por el Departamento de Aseguramiento de la Calidad del Centro de Bioactivos Químicos algunos de estos

documentos, y otros están en proceso de registro. En la siguiente lista se recogen algunos de estos documentos:

- PNO Manejo y eliminación de desechos.
- PNO Limpieza de la cristalería y material quirúrgico.
- PNO FCE.I.04.004 Funcionamiento y cuidado de la estufa.
- IT.FCE.I.04.004 Instrucciones de trabajo de la estufa.
- PNO FCE.I.04.003 Funcionamiento y cuidado del calentador-agitador RH basic 2.
- IT.FCE.I.04.003 Instrucciones de trabajo del calentador-agitador RH basic 2.
- PNO FCE.I.04.001 Funcionamiento y cuidado del agitador Vortex.
- IT.FCE.I.04.001 Instrucciones de trabajo del agitador Vortex.
- PNO. FCE.I.04.009 Funcionamiento y cuidado del bidestilador de agua.
- PNO. FCE. I.04.014 Funcionamiento y cuidado del refrigerador.

A continuación se expondrá una descripción más detallada de los procedimientos que están relacionados directamente con los estudios de Bioequivalencia *in vitro*.

3.3 Metodología desarrollada para los estudios de bioequivalencia *in vitro*

3.3.1 Etapas del proceso

En la figura 3.3 se representan las etapas propuestas por la UMEB, para el desarrollo de un Estudio de Bioequivalencia in vitro.

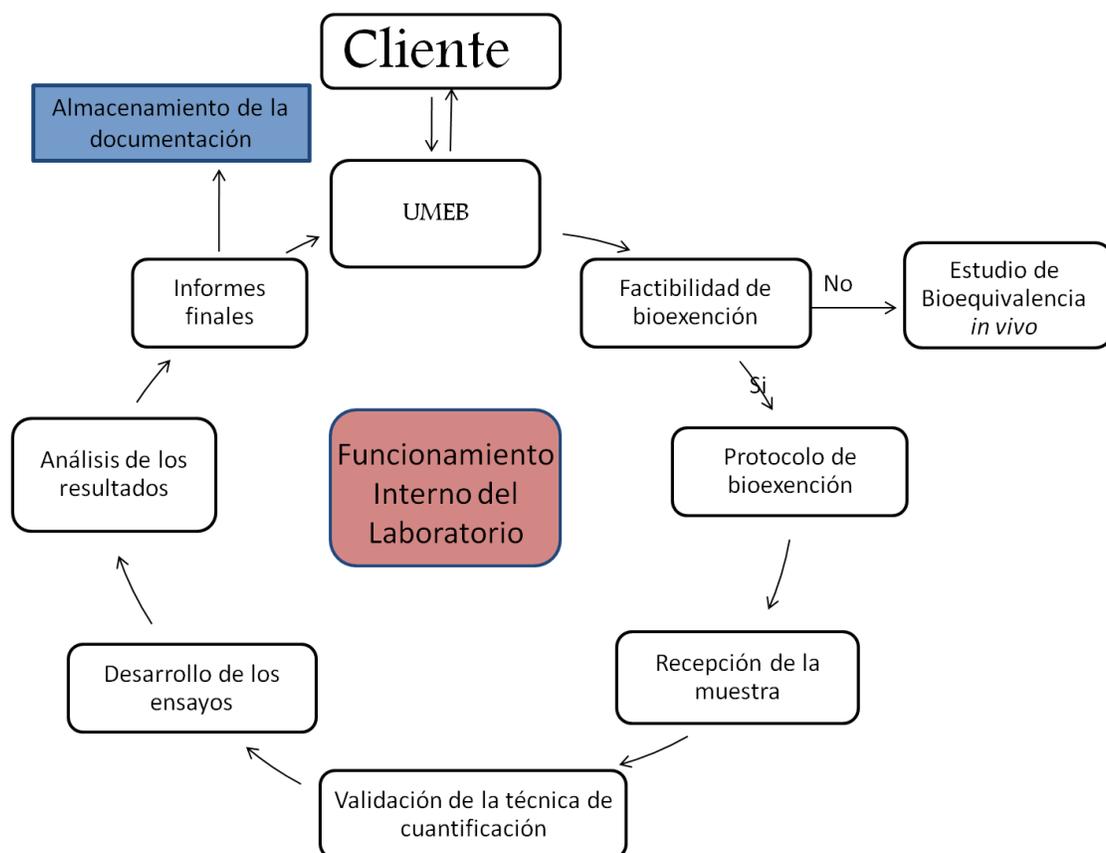


Figura 3.3 Representación gráfica de las diferentes etapas que conforman el Estudio de Bioequivalencia *in vitro* a desarrollar en la UMEB.

A continuación se expondrán detalladamente las etapas declaradas por la UMEB las cuales componen el Estudio de Bioequivalencia *in vitro*. Cada etapa tiene establecido uno o varios procedimientos, registros y/o protocolos cuyo cumplimiento aseguran la calidad del servicio involucrado en la misma.

3.3.2 Descripción de las etapas involucradas

3.3.2.1 Factibilidad de bioexención

En esta etapa inicial del estudio se le ofrece al cliente una evaluación integral de su producto (basada en la literatura especializada), se clasifica provisionalmente el ingrediente farmacéutico activo según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica y se dictamina sobre la posibilidad de que el medicamento (genérico) sea

bioexonerado de ensayos de bioequivalencia *in vivo* en humanos, demostrando su intercambiabilidad terapéutica mediante un Estudio de Bioequivalencia *in vitro* (ensayo de velocidad de disolución) (6, 25, 29, 30). En la figura 3.4 se describe el procedimiento para establecer la bioexención comenzando por una evaluación de las características polimórficas del fármaco, así como el índice terapéutico, además se deberán caracterizar los excipientes y garantizar que estos no tienen efectos sobre las características o los procesos farmacocinéticos del principio activo. Posteriormente se pasará a clasificar el fármaco según el SCB, siendo posible bioexonerar fármacos de clase I o III (31).

El dictamen final se realiza a través de un informe de experto (*Informe de factibilidad de bioexención*) y para su correcta elaboración se estableció el *PNO Confección del Informe de factibilidad de bioexención*, (Anexo 1).

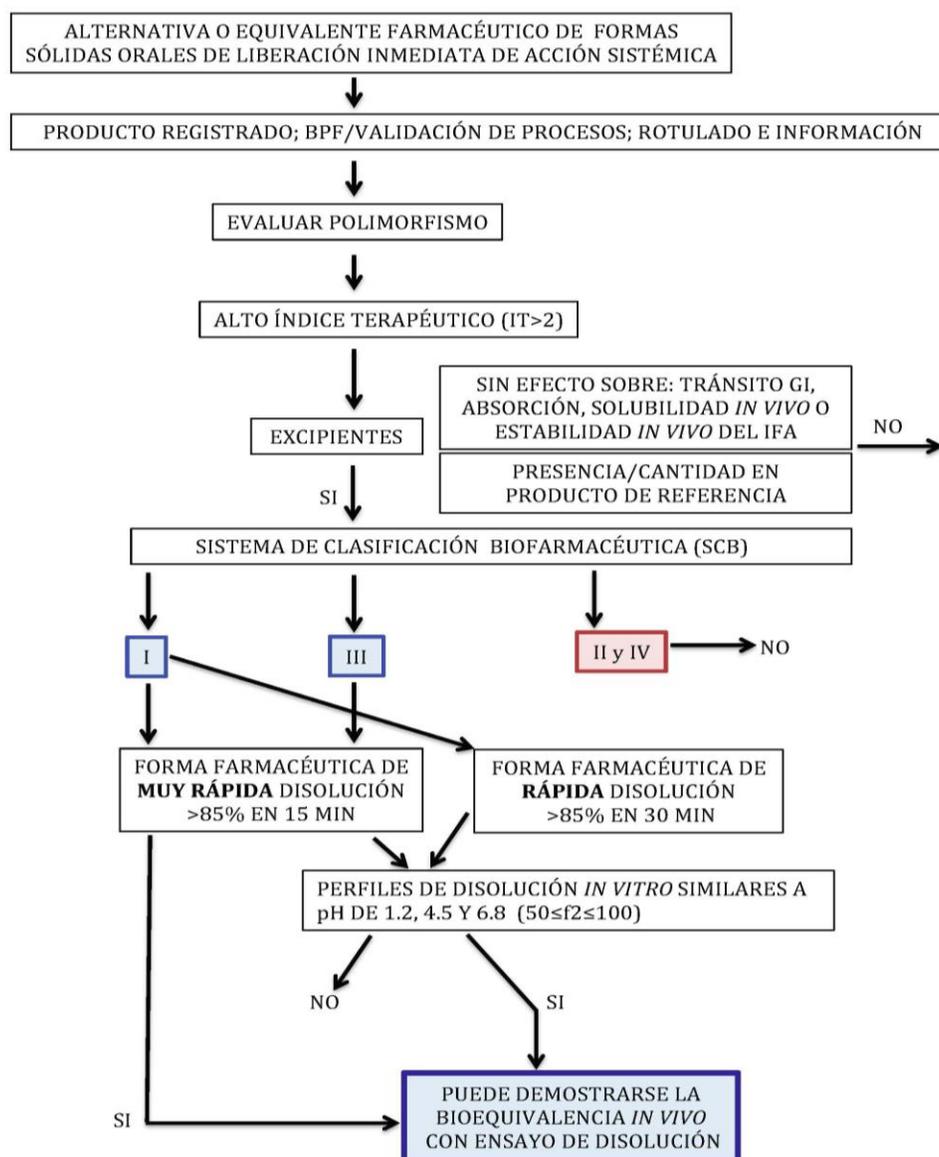


Figura 3.4 Diagrama para la bioexención de estudios de bioequivalencia *in vivo* en humanos, de formas sólidas orales de liberación inmediata, utilizando ensayos de disolución *in vitro*, de acuerdo al SCB.

3.3.2.2 Protocolo de bioexención

Dando continuidad a la etapa de factibilidad de bioexención, y en caso de que se demuestre que es posible la demostración de la intercambiabilidad terapéutica del genérico en estudio a través de un ensayo de velocidad de disolución, se procede

a la elaboración del Protocolo del estudio de bioexención. El mismo brinda información detallada sobre los fármacos en estudio y sobre el ensayo en general. Dentro de la información incluida tenemos: nombre del estudio, objetivo, información sobre los principios activos, la metodología a emplear, equipos, reactivos, etc., en sentido general abarca toda la información posible que se relacione con la investigación (32, 33).

Para la confección y redacción del Protocolo de bioexención se elaboró el PNO I.G.001 Confección del Protocolo de Bioexención (Anexo 2).

3.3.2.3 Recepción de la muestra

La UMEB debe garantizar que las muestras que lleguen para los estudios de bioequivalencia *in vitro* estén en perfectas condiciones y sean manipuladas, identificadas y almacenadas de manera correcta, de acuerdo a sus especificaciones, mientras dure el proceso de investigación (18, 34). Para ello, se confeccionó el PNO I.12.001 Recepción, identificación y almacenamiento de muestras para Estudios de Bioequivalencia in vitro (Anexo 3).

Este PNO tiene como anexo el Registro de Recepción de muestras, donde queda recogida la información necesaria de las muestras una vez estas lleguen al laboratorio, por lo que reviste vital importancia el correcto llenado del mismo.

3.3.2.4 Validación de la técnica de cuantificación

Esta etapa depende del tipo de ensayo a realizar en el laboratorio y que estaría definido en el Protocolo de Bioexención. Para cada ensayo se deberá elaborar un “Protocolo de validación de la técnica para el método de ensayo” (Anexo 4) donde se detallará todo el proceso de validación, la manera en se llevará a cabo y los parámetros a medir (21). En este sentido, un máximo de tres protocolos de validación pudieran ser desarrollados: Protocolo de validación de la técnica para el ensayo de velocidad de disolución, Protocolo de validación de la técnica para el ensayo de permeabilidad y Protocolo de validación de la técnica para el ensayo de solubilidad.

Cada protocolo se deberá elaborar teniendo en cuenta el PNO M.01.003 “Redacción, revisión y aprobación del protocolo de validación de método de ensayo”, elaborado por el departamento de Aseguramiento de la Calidad del CBQ, cada uno de ellos anexa un Registro de datos primarios asociado a cada parámetro estadístico evaluado.

En esta etapa además se deben considerar otros procedimientos vinculados con el funcionamiento de los equipos, técnicas, etc. Relativo al tipo de ensayo.

3.3.2.5. Desarrollo de los ensayos

Después de validadas las técnicas analíticas se procede a desarrollar cada uno de los ensayos previstos según los PNOs de cada una de las técnicas: PNO I.12.T01 Ensayo de disolución para cápsulas y tabletas de liberación inmediata, PNO I.12.T02 Ensayos de permeabilidad *in situ* y PNO I.12.T03 Ensayo de solubilidad, cada uno de estos PNO lleva implícito al menos un Registro de Datos Primarios en los que el personal que realice el ensayo anota exactamente todos los datos referidos y obtenidos en el momento en que se realiza la técnica. Además se deben tener en cuenta los PNOs Funcionamiento y cuidado de los equipos, así como las Instrucciones de trabajo de los mismos; igualmente estos PNOs de equipos llevan un Registro para su uso.

Siguiendo el orden establecido en esta etapa, quedarían recogidos los siguientes documentos:

- PNO Ensayo de disolución (Anexo 5)
 - Registro de Datos Primarios
- PNO Ensayos de permeabilidad (Anexo 7)
 - Registro de Datos Primarios
- PNO Ensayo de solubilidad (Anexo 6)
 - Registro de Datos Primarios
- PNO Funcionamiento y cuidado de equipos.

- Instrucciones de trabajo.
- Registro de Uso
- PNO FCE.I.04.012 “Funcionamiento y Cuidado de la Balanza Analítica”. (Anexo 8)
- PNO FCE.I.04.013 “Funcionamiento y Cuidado de la Balanza de Plato”. (Anexo 10)
- PNO FCE.I.04.026 “Funcionamiento y Cuidado del pHmetro”. (Anexo 12)
- PNO FCE.I.04.011 “Funcionamiento y cuidado del baño de agua termostatzado”. (Anexo 14)
- PNO FCE.I.04.002 “Funcionamiento y Cuidado del Disolutor”. (Anexo 16)
- PNO FCE.I.04.016 “Funcionamiento y Cuidado de la Centrifuga”. (Anexo 18)
- PNO FCE.I.04.010 “Funcionamiento y Cuidado del Espectrofotómetro Ultravioleta Visible”. (Anexo 20)
- PNO FCE.I.04.005 “Funcionamiento y Cuidado de la Campana de extracción”. (Anexo 22)
- PNO FCE.I.04.006 “Funcionamiento y Cuidado del baño ultrasónico”. (Anexo 24)
- IT.FCE.I.04.012 Instrucción de Trabajo de Equipo del Balanza Analítica. (Anexo 9)
- IT.FCE.04.013 Instrucción de Trabajo de Equipo de la Balanza de Plato. (Anexo 11)
- IT.FCE.I.04.026 Instrucción de Trabajo del phmetro. (Anexo13)
- IT.FCE.I.04.011 Instrucción de Trabajo de Equipo del Baño de agua termostatzado. (Anexo 15)
- IT.FCE.I.04.002 Instrucción de Trabajo del Disolutor. (Anexo 17)
- IT.FCE.I.04.016 Instrucción de Trabajo de Equipo de la Centrifuga. (Anexo 19)

- IT.FCE.02.001 Instrucción de Trabajo. Espectrofotómetro Ultravioleta – Visible (UV-VIS). (Anexo 21)
- IT.FCE.02.005 Instrucción de Trabajo. Campana de extracción. (Anexo 23)
- IT.FCE.02.006 Instrucción de Trabajo. Baño ultrasónico. (Anexo 25)

A continuación se muestra la distribución de los equipos utilizados por cada ensayo, figura 3.5, 3.6 y 3.7.

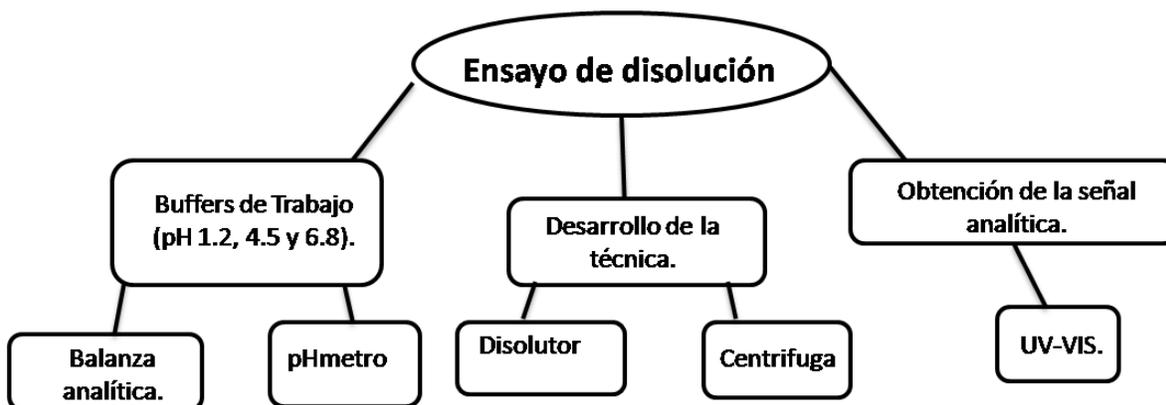


Figura 3.5 Distribución de los equipos en el ensayo de disolución.

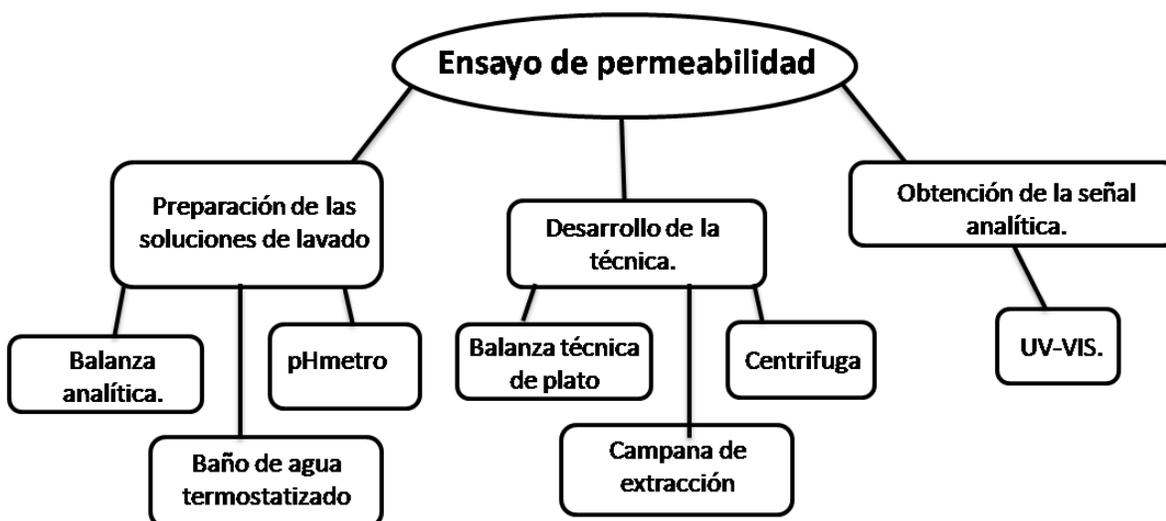


Figura 3.6 Distribución de los equipos en el ensayo de permeabilidad in situ.

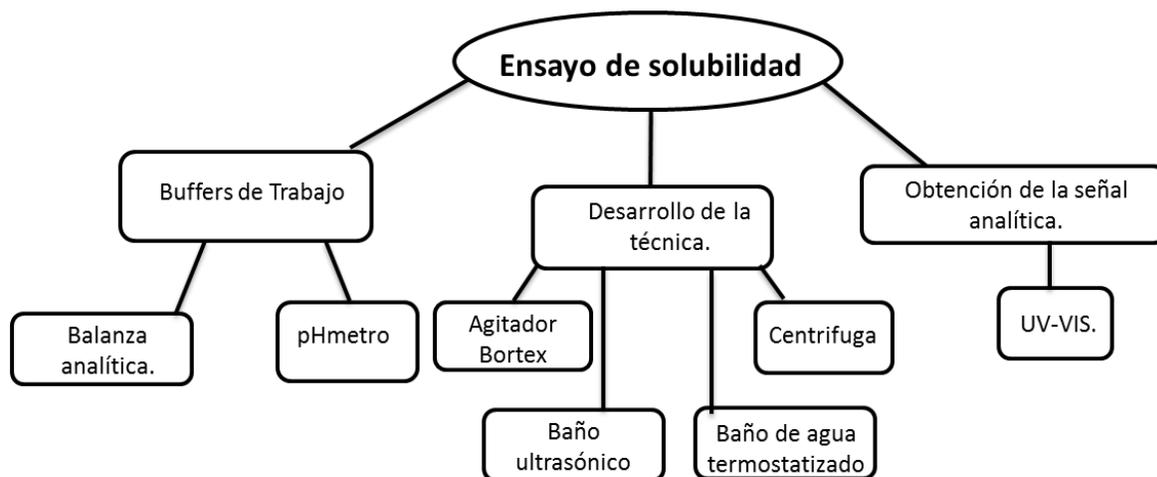


Figura 3.7 Distribución de los equipos en el ensayo de solubilidad.

3.3.2.6 Análisis estadístico de los resultados

Una vez que se obtienen los resultados de cada ensayo, corresponde el análisis estadístico de los mismos, lo cual se hace de acuerdo a lo descrito en cada una de las técnicas de ensayo (19, 35). Los cálculos son realizados en hojas Excel previamente elaboradas. Este documento debe ser validado siempre que se comience un nuevo estudio mediante un juego de datos obtenidos solo para este fin, así se garantiza que los resultados obtenidos sean los correctos. Para lograr lo antes expuesto se confeccionó el PNO I.12.001 Control de datos para los estudios de Bioequivalencia *in vitro* (Ver anexo 26), el mismo deberá ser controlado periódicamente por el jefe de laboratorio, y plasmado correctamente en el Registro de validación de hojas de cálculo.

3.3.2.7 Elaboración de informes finales

Después de procesada toda la información obtenida de cada uno de los ensayos realizados, deberá elaborarse un Informe final, el mismo mostrara los resultados obtenidos en el estudio. Para la confección de este Informe se elaboró el PNO I.G.002 Confección de informes finales.

3.3.2.8 Almacenamiento de la documentación

Toda la documentación generada como resultado de los estudios de bioequivalencia *in vitro*, informes finales, protocolos, registros, etc., serán almacenados según se indica en el PNO D.004 Conservación, modificación y derogación de la documentación del SGI del CBQ, elaborado por el departamento de aseguramiento de la calidad, aplicable a todos los informes procedentes de las investigaciones, adaptando su contenido a el estudio realizado. En este documento se indica el tiempo que deben permanecer archivados, tanto en formato electrónico como en soporte duro, las personas que pueden acceder a la información y los lugares destinados para archivar la documentación.

Conclusiones

1. La metodología propuesta para el desarrollo de los estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB está formada por 7 etapas técnicas, las cuales facilitarán el flujo de trabajo propuesto.
2. Se elaboraron 16 procedimientos normalizados de operación vinculados a las diferentes etapas para el desarrollo de los estudios de bioequivalencia *in vitro*, 14 registros de datos primarios, 9 instrucciones de trabajo de los equipos a emplear y un protocolo de validación.
3. Se elaboró por vez primera una metodología, basada en las principales regulaciones internacionales y nacionales de demostración de la intercambiabilidad de genéricos, para el desarrollo de estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB.

Recomendaciones

1. Confeccionar otros procedimientos involucrados en el funcionamiento interno del laboratorio y que tributen al servicio de estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB.
2. Implementar la metodología propuesta para el desarrollo de estudios de bioequivalencia *in vitro* en la UMEB.

Referencias bibliográficas

1. GONZÁLEZ CAS. Experiencia Reguladora Cubana en Calidad y Bioequivalencia para la Intercambiabilidad Terapéutica de Medicamentos Genéricos. *Acta Farm Bonaerense*. 2006;25(3):468-73.
2. Moreno Exebio L. Aspectos éticos de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia de productos farmacéuticos contenidos en las legislaciones de América Latina. *Acta bioethica*. 2004;10(2):247-59.
3. Saavedra I. Estudios de biodisponibilidad para establecer bioequivalencia de medicamentos. *Cuadernos Médico Sociales*. 2010;50(1).
4. Kaur P, Jiang X, Duan J, Stier E. Applications of In Vitro–In Vivo Correlations in Generic Drug Development: Case Studies. *The AAPS journal*. 2015;17(4):1035-9.
5. Laosa O, Guerra P, López-Durán JL, Mosquera B, Frías J. Estudios de bioequivalencia: la necesidad de establecer la fiabilidad de los medicamentos genéricos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2009;26(4):553-62.
6. Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical research*. 2002;19(7):921-5.
7. Polli JE. In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *The AAPS journal*. 2008;10(2):289-99.
8. Administration FD. Guidance for industry. Bioavailability and bioequivalence. Studies submitted in NDAs or INDs general considerations. Silver Spring, MD. 1995.
9. Chavda H, Patel C, Anand I. Biopharmaceutics classification system. *Systematic reviews in pharmacy*. 2010;1(1):62.
10. Use CfMPfH. Guideline on the investigation of bioequivalence. European Medicines Agency (EMA), London. 2010.

11. Administration FD. Guidance for industry. Bioavailability and bioequivalence. Studies submitted in NDAs or INDs general considerations. Silver Spring, MD. 2014.
12. Organization WH. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. 2005. Working document QAS/04.093/Rev. 4. WHO Technical Report Series) 2015:347-90.
13. Espina CF, Mazziotta D. Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico: Ed. Médica Panamericana; 2005.
14. Certificación ICdNTy. Norma NTC-ISO-IEC 17025 Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayos y calibración. ICONTEC Bogotá eDC: DC; 2002.
15. Quintana Esquivel MG, Apezteguía Rodríguez I. Las Buenas Prácticas en la Producción de Biológicos y los Sistemas de Gestión de la Calidad. Revista Cubana de Farmacia. 2010;44(4):547-57.
16. Sánchez González CA. Respaldo de la reglamentación farmacéutica cubana para la intercambiabilidad terapéutica de los medicamentos genéricos. Revista Cubana de Farmacia. 2004;38(1):1-.
17. Uppoor VRS. Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations. Journal of controlled release. 2001;72(1):127-32.
18. CECMED. 37-2012. Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos. La Habana: CECMED. 2012.
19. Álvarez IG, Pérez MÁC, Sanz MdVB. Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos: Universidad Miguel Hernández; 2015.
20. Food, Administration D. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system: guidance for industry. Food and Drug Administration Rockville, MD 2015.
21. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1992;81(3):309-12.

22. XXII UP, XVII N. US Pharmacopeial convention. Rockville, Md. 1990:1788-9.
23. Products CfPM, editor European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Meeting Feb; 1998.
24. Bavestrello L. Bioequivalencia:¿ Debemos exigirla? Revista chilena de infectología. 2003;20:38-40.
25. Guía Técnica G-B. Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad / Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales. Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). 2007.
26. Parr A, Hidalgo IJ, Bode C, Brown W, Yazdanian M, Gonzalez MA, et al. The Effect of Excipients on the Permeability of BCS Class III Compounds and Implications for Biowaivers. *Pharmaceutical research*. 2016;33(1):167-76.
27. Preparations WECoSfP. WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations. Fortieth report. World Health Organization technical report series. 2006;937:1.
28. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2004;58(2):265-78.
29. Pabst G, Jaeger H. Review of methods and criteria for the evaluation of bioequivalence studies. *European journal of clinical pharmacology*. 1990;38(1):5-10.
30. Baena Y, DLeón LP. Importancia y fundamentación del sistema de clasificación biofarmacéutico, como base de la exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia in vivo. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 2008;37(1).
31. Brito Y, Cabrera M, Fernández M. Clasificación biofarmacéutica provisional de los ingredientes farmacéuticos activos de los sólidos orales de liberación inmediata del cuadro básico de medicamentos de Cuba. Santa Clara: Universidad Central Marta Abreu de las Villas; 2015.

32. Chow SC, Shao J, Wang H. In vitro bioequivalence testing. *Statistics in medicine*. 2003;22(1):55-68.
33. Chow S-C, Liu J-P. *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies*: CRC press; 2008.
34. Morejón M. *Las buenas prácticas aplicadas al laboratorio clínico en Cuba (CECMED)*. La Habana: Editorial Sociedades Científicas. 2010.
35. Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu J-P. In vitro dissolution profile comparison—statistics and analysis of the similarity factor, f_2 . *Pharmaceutical research*. 1998;15(6):889-96.

Anexos

Anexo #1



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Elaboración del Informe de Factibilidad de Bioexención.	PNO:
	Hoja No: 44 de 126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este documento establece los principios generales para la elaboración del Informe de Factibilidad de Bioexención que se confecciona como resultado de los Estudios de Bioequivalencia desarrollados en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas (UMEB) del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ).

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable todos los Informes de Factibilidad de Bioexención que se elaboren en la UMEB.

3 Términos y definiciones

bioexención: Es la capacidad que presenta un producto de liberación inmediata de ser eximido de la obligación de tener que presentar estudios de bioequivalencia “*in vivo*” para el establecimiento de la Equivalencia Terapéutica, la cual puede demostrarse mediante estudios “*in vitro*”, a partir de su clasificación biofarmacéutica y aspectos como las propiedades farmacocinéticas, solubilidad, y excipientes, entre otras, basándose en una comparación del perfil de disolución *in vitro* entre el producto en estudio y el producto de referencia.

factibilidad de bioexención: Es la posibilidad de que un fármaco pueda ser bioexonerado.

4 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

Los Técnicos del laboratorio de la UMEB y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

5 Procedimiento

5.1 Para la confección del Informe de Factibilidad de Bioexención, se tomó como guía el PNO I.G.001 “*Metodología para la confección de los protocolos de investigación*”, principalmente en las temáticas siguientes:

1. Generalidades
2. Forma
3. Período de entrega
4. Distribución del Informe
5. Estructura del Informe
 - Hoja inicial o portada
 - Contenido del Informe (ver 5.3)
 - Hoja Terminal (información relacionada con los nombres, cargos y firmas de los que confeccionan, revisan y aprueban el Informe)

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel A. Cabrera Pérez
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Elaboración del Informe de Factibilidad de Bioexención.	PNO:
	Hoja No: 45 de 126
	Edición: 1

5.2 Para la confección del Informe de Factibilidad de Bioexención, el contenido del PNO I.G.001 debe ajustarse siempre que proceda.

5.3 El contenido del Informe de Factibilidad de Bioexención contará con la siguiente información:

5.3.1 Informe Resumen del estudio y Conclusión

Ambos de manera breve y que contengan un análisis de la literatura con el objetivo de obtener datos relevantes en la decisión de eximir de estudios de bioequivalencia *in vivo* a formas sólidas orales de liberación inmediata del fármaco propuesto; también se incluirá información sobre el uso terapéutico del fármaco y su índice terapéutico, las propiedades farmacocinéticas y los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia se toman en consideración para determinar la posibilidad de recomendar una bioexención según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).

5.3.2 Objetivo

Evaluación final de la posibilidad de bioexención del compuesto en estudio.

5.3.3 Introducción

Incluirá una clasificación biofarmacéutica provisional del fármaco en estudio y la posibilidad de eximir de estudios de bioequivalencia *in vivo*, además se hará una revisión de los datos relevantes de la literatura que garanticen la factibilidad en la toma de decisión sobre la bioexención, al mismo tiempo se validará el riesgo asociado con la bioexención o lo que es lo mismo, la probabilidad de llegar a una decisión de bioequivalencia incorrecta y la valoración de las consecuencias de esa decisión sobre la salud pública y el paciente individual.

5.3.4 Características generales del fármaco.

Deberá indicar el nombre y la estructura química del ingrediente farmacéutico activo en estudio, así como información sobre indicaciones terapéuticas, dosis recomendada e índice terapéutico.

5.3.5 Propiedades Físicoquímicas

Se brinda la información siguiente:

- Se indicará información sobre el tipo de polvo, color del polvo, solubilidad en diferentes solventes y polimorfismo.
- Se reportarán los datos experimentales y computacionales encontrados sobre Log P (coeficiente de reparto octanol-agua) y Log D (coeficiente de distribución).
- Se brindará información sobre la constante de disociación del fármaco (pka) descritos en la literatura, tipo de compuesto (ácido o base débil) y efecto de la solubilidad en el rango de pH fisiológico.
- Se mostraran valores de solubilidad del fármaco en estudio por varias referencias bibliográficas (Farmacopea Europea, USP, etc.), completando la tabla del Anexo 1.
- Se describirá la dosis sugerida del fármaco en estudio según la literatura.

5.3.6 Propiedades Farmacocinéticas

5.3.6.1 Permeabilidad y Absorción.

5.3.6.1.1 Datos *in vitro*

Se reportarán los datos pertenecientes con:

- Log P y ClogP

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel A. Cabrera Pérez
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Elaboración del Informe de Factibilidad de Bioexención.	PNO:
	Hoja No: 46 de 126
	Edición: 1

- Ensayos de permeabilidad en líneas celulares (Caco-2 y MDCK)
- Ensayos de permeabilidad en membranas artificiales (PAMPA y BAMPA)
- Ensayos de permeabilidad en segmentos intestinales aislados de rata

Datos *in vitro*, especificando el modelo utilizado. Completar la tabla del Anexo 2.

5.3.6.1.2 Datos *in situ*

Se reportarán los datos de los ensayos de permeabilidad con modelos de perfusión *in situ* en rata.

5.3.6.1.3 Datos *in vivo*

Se reportarán los datos obtenida de la información recolectada de la literatura sobre:

- Permeabilidad
- Absorción y Biodisponibilidad
- Distribución
- Metabolismo y Excreción
- Efecto

5.3.7 Comportamiento de la forma de dosificación

Se identificará en la literatura especializada, estudios que muestren resultados de bioequivalencia entre formulaciones de liberación inmediata del principio activo bajo estudio, para validar la seguridad en la intercambiabilidad entre diferentes genéricos, aprobados y registrados por las diferentes Agencias Regulatorias.

5.3.8 Discusión

5.3.8.1 Solubilidad

Se expondrán todos los resultados sobre solubilidad de la mayor dosis administrada disuelta en 250 mL en un rango de pH=1.2-6.8 a $37 \pm 10C$ para ser considerada para bioexención y se dará una clasificación del fármaco.

5.3.8.2 Permeabilidad

Se describirán los datos de permeabilidad encontrados según el método establecido y se dará una clasificación del fármaco.

5.3.8.3 Clasificación Provisional del fármaco según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).

Se hará una clasificación biofarmacéutica provisional del compuesto en estudio y se tomarán en consideración los datos presentados por cada una de las metodologías desarrolladas, así como los datos disponibles para solubilidad y permeabilidad y finalmente se concluirá a qué grupo del BCS pertenece el fármaco en estudio.

5.3.9 Riesgo del paciente asociado con bioinequivalencia.

Se hará un análisis de los riesgos y beneficios de una bioexención para productos sólidos orales de liberación inmediata que contenga el fármaco en estudio como ingrediente farmacéutico activo.

5.3.10 Conclusiones

Finalmente se hará una valoración general de la clasificación propuesta.

5.3.11 Referencias Bibliográficas.

Se definirá correctamente toda la bibliografía utilizada.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel A. Cabrera Pérez
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Elaboración del Informe de Factibilidad de Bioexención.	PNO:
	Hoja No: 47 de 126
	Edición: 1

5.4 Archivo

Una vez aprobado el informe de los resultados del ensayo, se deberá archivar en formato impreso en la UAC conjuntamente con los datos originales y registros como parte del "Expediente de estudios terminados".

7 Bibliografía

PNO D.001 "Metodología para la elaboración y revisión de los PNO e Instrucciones de Trabajo".

PNO I.G.001 "Metodología para la confección de los protocolos de investigación"

Formulario F-BIOF 06: Presentación de resultados de estudios in vitro para optar a bioexención de estudios de BE in vivo para demostrar equivalencia terapéutica (Eq). Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

Anexo 1

Tabla 1. Datos de solubilidad (mg/mL) del fármaco en estudio, en diferentes medios, y sus correspondientes valores de la relación Dosis/Solubilidad (D/S) (mL) a 37°C para las diferentes dosis máximas descritas en la literatura.

<i>Medio (pH)</i>	<i>Solubilidad (mg/mL)</i>			<i>Dosis / Solubilidad^b (mL)</i>		
	<i>25 °C</i>	<i>30 °C</i>	<i>37 °C</i>	<i>Dosis 1</i>	<i>Dosis 2</i>	<i>Dosis n</i>
Agua						
Buffer (pH=?)						
Medios simulados (pH=?)						

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel A. Cabrera Pérez
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Elaboración del Informe de Factibilidad de Bioexención.	PNO:
	Hoja No: 48 de 126
	Edición: 1

Anexo 2

Tabla 3. Datos de permeabilidad del fármaco en estudio (estándar de referencia) utilizando modelos *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo* que se han descrito en la literatura.

Compuesto	<i>In silico</i>		<i>In vitro</i>					<i>In situ</i>	<i>In vivo</i>	
	LogP	CLogP	Caco-2 $\times 10^{-6}$ (cm/s) ^a	MDCK $\times 10^{-6}$ (cm/s) ^c	BAMPA $\times 10^{-6}$ (cm/s) ^d	PAMPA $\times 10^{-6}$ (cm/s) ^e	Tejido rata $\times 10^{-6}$ (cm/s) ^f	Perfusión rata $\times 10^{-6}$ (cm/s) ^g	Perfusión humanos $\times 10^{-4}$ (cm/s) ^h	FA (%) ^j
Fármaco en estudio										
Metoprolol	1.72 ⁴	1.35 ⁴	20 ^b	41 ⁵³	5.67 ⁵⁵	3.5 (pH=5-7) ⁵⁶	16.7 ⁵⁷	20 ³²	1.34 ⁵⁸	95 ³³
				19 ¹⁷				33 (IP) ⁵⁸	1.3 ⁵⁹	
				29.6 ⁵⁴				59 (ID) ⁵⁹	1.5 ⁶⁰	

^a Valores de permeabilidad (apical-basolateral) en células Caco-2; ^b Valor medio de permeabilidad en Caco-2 del metoprolol; ^cValores de permeabilidad (apical-basolateral) en células MDCK; ^dPermeabilidad en membranas artificiales biomiméticas (BAMPA); ^e Permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA); ^f Permeabilidad en tejido intestinal de rata; ^g Permeabilidad en modelos de perfusión de paso simple en segmentos intestinales de rata; ^h Permeabilidad en modelos de perfusión en humanos según el método de dos balones (Loc-I-Gut); ⁱPermeabilidad en modelos de perfusión abierto; ^jFracción absorbida en humanos; IP: Intestino proximal; ID: intestino distal.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel A. Cabrera Pérez
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #2



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Confección del Protocolo de Bioexención.	PNO:
	Hoja No: 049 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece las indicaciones para la correcta elaboración de los Protocolos de Bioexención que se confeccionen en el Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas (UMEB) perteneciente al Centro de Bioactivos Químicos (CBQ).

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable a todos los Protocolos de Bioexención que se confeccionen en el Laboratorio de la UMEB.

3 Términos y definiciones

bioexención: Es la capacidad que presenta un producto de liberación inmediata de ser eximido de la obligación de tener que presentar estudios de bioequivalencia “*in vivo*” para el establecimiento de la Equivalencia Terapéutica, la cual puede demostrarse mediante estudios “*in vitro*”, a partir de su clasificación biofarmacéutica y aspectos como las propiedades farmacocinéticas, solubilidad, y excipientes, entre otras, basándose en una comparación del perfil de disolución *in vitro* entre el producto en estudio y el producto de referencia.

4 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal y responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO. Los Técnicos del laboratorio en cuestión y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

5 Procedimiento

5.1.1 Para la confección del Protocolo de Bioexención, se tomó como guía el PNO I.G.001 “*Metodología para la confección de los protocolos de investigación*”, principalmente en las temáticas siguientes

- Elementos para la presentación del Protocolo
 - Forma
 - Período de entrega
 - Enmiendas y desviaciones del protocolo
 - Distribución del Protocolo
- Estructura del Protocolo
 - Portada
 - Contenido del Protocolo (**ver 5.2.3**)
 - Hoja terminal (información relacionada con los nombres, cargos y firmas de los que confeccionan, revisan y aprueban el Protocolo)
 -

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel Angel Cabrera Pérez
Firma:	Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Confección del Protocolo de Bioexención.	PNO:
	Hoja No: 050 de 0126
	Edición: 1

5.2.2 El contenido del PNO I.G.001 "Metodología para la confección de los protocolos de investigación" debe ajustarse siempre que proceda a la hora de confeccionar el Protocolo de Bioexención.

5.2.3 Este punto dentro del contenido del Protocolo, se enriquecerá con la información que se brinda en el PNO I.12.T01 "Ensayo de disolución para capsulas y tabletas de liberación inmediata", que es el Procedimiento para desarrollar esta técnica en el Laboratorio.

6 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO, mediante auditorías internas, supervisiones por la alta dirección y mandos intermedios, así como mediante las inspecciones y auditorías que realice la UAC.

7 Requisitos de documentación

Se deberá llenar correctamente el Registro de Protocolos de investigación, I.G.001/1 (ver Anexo 1) y el Registro de Servicios de ensayos I.G.001/2 (ver Anexo 2).

8 Bibliografía

- PNO D.001 "Metodología para la elaboración y revisión de los PNO e Instrucciones de Trabajo".
- PNO I.G.001 "Metodología para la confección de los protocolos de investigación"
- PNO I.12.T01 "Ensayo de disolución para capsulas y tabletas de liberación inmediata".
- Regulación No. 48/ 2007 "Requisitos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata".

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones Garcia	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel Angel Cabrera Pérez
Firma:	Fecha:	Firma:
		Fecha:

Anexo #3



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Recepción, identificación y almacenamiento de muestras para estudios de Bioequivalencia.	PNO:I.12.001
	Hoja No: 01 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos para la recepción, identificación y almacenamiento de las muestras que llegan al Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB), para los estudios de bioequivalencia.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable a todas las muestras que llegan al Laboratorio de la UMEB, para los estudios de bioequivalencia.

3 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

Los Técnicos del laboratorio de la UMEB y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Procedimiento

4.1 Las muestras al ser recibidas deben venir acompañadas de una solicitud de ensayo debidamente revisada y firmada, que contenga la siguiente información:

- Nombre del producto, dosis y forma farmacéutica.
- N° de lote y fecha de fabricación.
- Nombre de la institución o inspector que proporcionó la muestra.
- Cantidad de la muestra.
- Propósito de la solicitud.
- Fecha en la cual se tomó la muestra.
- Condiciones de almacenamiento.
- Ensayos solicitados y especificaciones de calidad a ser usada en el análisis.
- Fecha de vencimiento (para producto farmacéutico) o fecha de reanálisis (para ingrediente farmacéuticamente activo o excipiente farmacéutico).

4.2 A cada muestra se le asignará un código que contendrá la siguiente información:

- Si es un fármaco Genérico (FG) o Innovador (FI)
- Número consecutivo de entrada al Laboratorio
- Año de recepción de la muestra

La información especificada estará separada por un guion quedando finalmente de la siguiente manera: FX-XX-XX.

4.3 Se anotan con claridad los datos en el Registro de Recepción de muestras de la UMEB, Anexo 1.

4.4 Las muestras recepcionadas se colocarán en el lugar de almacenamiento mientras dure el ensayo.

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: Dr. Miguel Á. Cabrera Pérez
Firma:	Fecha:	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Recepción, identificación y almacenamiento de muestras para estudios de Bioequivalencia.	PNO: I.12.001
	Hoja No: 01 de 0126
	Edición: 1

4.5 En el lugar de almacenamiento, las muestras estarán protegidas del frío, la humedad, la luz, el calor, etc

4.6 El lugar de almacenamiento de las muestras para los ensayos deberá decir “**Muestras para ensayos**”.

5 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

6 Requisitos de documentación

Se llena correctamente el Registro de Recepción de Muestras con código I.12.001/1, Anexo 1.

7 Bibliografía

Regulación N° 37-2012 Buenas prácticas de laboratorio para el control de medicamentos.

NC-ISO/IEC 17025: 2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.

Registro de Recepción de Muestras

CBQ Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas			REGISTRO DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS				Código: I.12.001/1	
							Área: UMEB	
							Página:	
No.	Nombre del Producto	<i>Nombre del Proveedor</i>	No. Lote	Fecha de Recepción	Cant. Total	Código	Nombre y Firma del que Recepciona	Observaciones

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Aprobado por: Dr. Miguel Á. Cabrera Pérez
Firma:	Fecha:	Firma:
		Fecha:

Anexo #4



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DE MÉTODO DE ENSAYO

Título

Protocolo de validación del método de ensayo para la técnica de velocidad de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata con acción sistémica, por Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-VIS).

Código: VE.16.01

Fecha final de aprobación: 2016-06-15

Director del Estudio

Nombre del Director del estudio de validación

Instalación de ensayo

Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas (UMEB).

Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central de Las Villas

PROTOCOLO DE VALIDACION DE METODO DE ENSAYO

Código: VE.16.01

Título: Protocolo de validación del método de ensayo para la técnica de velocidad de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata con acción sistémica, por Espectrofotometría Ultravioleta Visible (UV-VIS).

1 Objetivo

Demostrar que el método de ensayo para la técnica de velocidad de disolución en cápsulas y tabletas de liberación inmediata con acción sistémica, que se realiza en el Laboratorio de la UMEB, es lo suficientemente fiable como para producir resultados previstos dentro de intervalos definidos.

2 Alcance

Este protocolo es aplicable al método de ensayo de la técnica de velocidad de disolución que se realiza en el Laboratorio de la UMEB, como resultado de los Estudios de Bioequivalencia.

El método de ensayo que se utilizará, es un método desarrollado por el laboratorio y se empleará para demostrar la similitud entre los perfiles de disolución del producto Innovador y del Genérico, ambos pertenecientes a la clase I y también aceptable para fármacos de Clase III.

3 Categoría a la que pertenece el método y clasificación según sus características

3.1 Categoría

Es un método de análisis desarrollado en el laboratorio.

3.2 Clasificación

El método se encuentra en el grupo de los ensayos de contenido y actividad biológica, donde también pueden incluirse los ensayos de velocidad de disolución.

4 Participantes

Nombre y Apellidos	Nivel profesional y grado científico	Actividad	Responsabilidad	Correo electrónico

5 Materiales, reactivos, equipos, patrones y documentos

5.1 Materiales

Materiales	Cantidad
Tubos Falcon de 15 mL	7/ ensayo
Jeringuillas de 10 mL	7/ ensayo
Matraces de 10 mL	7/ ensayo
Cristalería de laboratorio (Beakers, pipetas, micropipetas)	Según necesidad

5.2 Equipos/ sistemas ingenieros

Equipos/ sistemas ingenieros	Especificaciones	Cualificación realizada
Campana de extracción		Según Plan de mantenimiento del Centro
Balanza analítica		Según Plan de verificación y/o calibración del Centro
pHmetro		Según Plan de verificación y/o calibración del Centro
Disolutor		Según Plan de verificación y/o calibración del Centro
Centrífuga		Según Plan de verificación y/o calibración del Centro
Espectrofotómetro UV-VIS		Según Plan de verificación y/o calibración del Centro

5.3 Reactivos

- Acido clorhídrico (HCl), p.a.
- Cloruro de sodio (NaCl), p.a.
- Acetato de sodio ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$, NaAc), p.a.
- Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$, HAc), p.a.
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), p.a.
- Hidróxido de sodio (NaOH), p.a.
- Agua bidestilada

5.4 Patrones o Material de Referencia

Ingrediente farmacéutico Activo (IFA) del fármaco en estudio.

5.5 Muestras de ensayo

Producto problema (Fármaco Genérico)

5.6 Documentos

Nombre del documento	Código
Funcionamiento y cuidado de la Campana de extracción	PNO FCE.I.04.005
Funcionamiento y cuidado de la Balanza analítica	PNO FCE.I.04.012
Funcionamiento y cuidado del pHmetro	PNO FCE.I.04.026
Funcionamiento y cuidado del Disolutor	PNO FCE.I.04.002

Funcionamiento y cuidado del Centrífuga	PNO FCE.I.04.016
Funcionamiento y cuidado del Espectrofotómetro UV-VIS	PNO FCE.I.04.010

6 Método de ensayo

6.1 Fundamento teórico del método

El método consiste en obtener el por ciento disuelto de los fármacos en estudio, a diferentes tiempos de muestreo (5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min) en un pH o medio de trabajo determinado (1.2, 4.5 ó 6.8). Para lograr lo antes expuesto, se disuelve la cápsula o tableta en el medio de trabajo y a la vez se toman muestras a los diferentes tiempos, las cuales se cuantifican por UV-VIS y se obtienen las concentraciones correspondientes, y de cada una de ellas el porcentaje disuelto de los fármacos. El ensayo debe realizarse en los tres pH especificados anteriormente.

6.2 Preparación de las disoluciones de trabajo

Las cantidades están dadas para el análisis de una muestra solamente.

6.2.1 Buffer pH 1.2

Se pesa con exactitud alrededor de 2 g de cloruro de sodio y se disuelve en agua bidestilada, luego se vierte la disolución anterior en un beaker de 2 L y se añaden 7 mL de ácido clorhídrico, después se adiciona alrededor de 1 L de agua bidestilada y se agita durante 5 min para lograr una buena homogenización. Seguidamente se mide y se ajusta el pH del medio de trabajo a 1.2 ($\text{pH} \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

6.2.2 Buffer pH 4.5

Se pesa con exactitud alrededor de 5.5 g de acetato de sodio y se disuelve en agua bidestilada, luego se vierte la disolución anterior en un beaker de 2 L y se añaden 3 mL de ácido acético glacial, después se adiciona alrededor de 1 L de agua bidestilada y se agita durante 5 min para lograr una buena homogenización. Seguidamente se mide y se ajusta el pH del medio de trabajo a 4.5 ($\text{pH} \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

6.2.3 Buffer pH 6.8

Se pesan con exactitud alrededor de 6.8 g de fosfato monobásico de potasio (hidrogeno fosfato de potasio) y 0,9 g de hidróxido de sodio y se disuelven en agua bidestilada en un beaker de 2 L, después se adiciona alrededor de 1 L de agua bidestilada y se agita durante 5 min para lograr una buena homogenización. Seguidamente se mide y se ajusta el pH del medio de trabajo a 6.8 ($\text{pH} \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

7 Pruebas de adecuación del sistema

Se comprobará con la repetibilidad instrumental, según las especificaciones del equipo, se tendrá en cuenta el valor de absorción y el de la longitud de onda en una muestra de referencia.

8 Diseño experimental, parámetros a evaluar y criterios de aceptación por parámetros. Análisis estadístico para el procesamiento de los resultados

Según la categoría y la clasificación del método a evaluar se determinarán los siguientes parámetros de validación: linealidad, exactitud (veracidad), precisión y especificidad.

8.1 Linealidad

Se realizará una curva de calibración con no menos de 5 puntos y un intervalo de concentraciones adecuado a la dosis del producto, con $\pm 20\%$ del rango especificado. Las curvas se prepararán en cada medio de trabajo y se obtendrán tres curvas en tres días diferentes y cada curva se realizará por triplicado.

Teniendo en cuenta los valores experimentales, se determinará:

- **Regresión:** en la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (debe ser ≥ 0.990) y el coeficiente de determinación (valores superiores a 0.98).
- **Linealidad:** el CV de los factores de respuesta (cociente respuesta / concentración), el cual no será superior al 5 %.
- **Proporcionalidad:** los resultados de este ensayo deberán incluir el 0 para el grado de proporcionalidad definido (para un nivel de confianza de 95 %)

Además se tendrán en cuenta la varianza de la pendiente de la línea de regresión, desviación estándar, desviación estándar relativa, límites de confianza de la pendiente y el grado de significación.

8.2 Precisión

Las muestras serán reales de producto terminado. Se realizará a dos niveles: intraensayo (repetibilidad) e interensayo (precisión intermedia). De ser posible puede realizarse interlaboratorio (Reproducibilidad).

8.2.1 Repetibilidad del método

Se realizarán 6 réplicas de la mezcla homogénea del producto o muestra, en el tiempo seleccionado del perfil obtenido, es decir, en el tiempo donde se obtuvo más de 85 % del producto disuelto.

8.2.2 Precisión intermedia

Se realiza semejante a 8.2.1 pero se realizará en días y con equipos diferentes.

Se calculará la media de las respuestas (X_m), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación ($CV \leq 3\%$). El intervalo de confianza debe ser reportado para cada tipo de precisión investigada.

8.3 Exactitud (veracidad)

Para el estudio de la exactitud se utilizarán muestras enriquecidas unidas a la matriz, el método a utilizar será el de adicionar cantidades conocidas del material de referencia (MR) al producto terminado (PT).

Se realizarán 9 determinaciones a tres concentraciones diferentes del intervalo especificado (inferior, medio y superior), en condiciones de repetibilidad (Ej.: tres concentraciones /tres réplicas cada una). Se calculará el por ciento de recobrado de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra

Se realizará una prueba t-student para determinar si el valor medio hallado y el valor considerado verdadero no difieren significativamente para un $\alpha = 0,05$.

8.4 Especificidad

Se realizará por HPLC, en caso de que no proceda se utilizará un procedimiento complementario que garantice la especificidad del método.

9 Cálculos

Los cálculos se realizarán en el documento Microsoft Office Excel 2007 “Cálculos para Estudios de Bioequivalencia”, donde solo se deben introducir los datos en las casillas en verdes y los resultados se expondrán automáticamente. La ubicación y otras informaciones de este documento se pueden hallar en el PNO I.12.003 “Control de Datos para Estudios de Bioequivalencia”.

10 Parámetros operacionales

Los parámetros operacionales de los principales equipos se exponen en el PNO I.12.004 “Ensayo de disolución para sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica. Comparación de perfiles de disolución”.

11 Registros y archivo

Para la recogida de los datos primarios se emplearán los modelos que se anexan a este protocolo, ver Anexo 1. El protocolo, los cambios, datos primarios e informe final, se mantendrán adecuadamente archivados en la Unidad de Aseguramiento de la Calidad (UAC) del CBQ durante el tiempo en que se encuentre en uso el método de ensayo validado, a partir de la fecha de aprobación del informe final.

12 Control de cambio

Las desviaciones que sean necesarias realizar a este protocolo de validación de método de ensayo deberán estar bien justificadas y ser incorporadas al protocolo sin desechar la información anterior. Deberán ser analizadas y autorizadas por la dirección del laboratorio y de la Unidad de Aseguramiento de la Calidad.

Si se propone cualquier cambio, modificación o desviación durante o después de efectuada la validación del método de ensayo se procederá según lo establecido en el PNO F.01.0.002 Control de cambios.

13 Cronograma de actividades

Actividad	Fechas que se proponen	
	Inicio	Propuesta de culminación
Redacción del Protocolo de Validación		
Aprobación del Protocolo de Validación		
Realización de la validación		
Registro de datos		
Evaluación de los resultados		
Redacción del Informe de validación		
Aprobación del Informe de Validación		

14 Bibliografía

1. Aguirre Ortega, L. y col. (2001). Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. España.
2. CEDMED. Regulación No. 41-2007. Validación de Métodos analíticos.
3. CEDMED. Regulación No. 37-2012 Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. Anexo 1.
4. PNO M.01.003 Redacción, revisión y aprobación del protocolo de validación de métodos de ensayo. CBQ. 2010.
5. PNO F.01.0.002 Control de cambios.

Este protocolo ha sido confeccionado, revisado y aprobado por:

	Nombre/ Cargo	Firma	Fecha
Confeccionado por:			
Revisado por:			
Aprobado por:			
Aprobado por:			

ANEXO 1

Registro de datos primarios para la determinación de la linealidad.

Día # _____

Analista (Nombre y Firma): _____ Fecha: _____ Masa del IFA (g): _____

Conc. de la disolución madre (mg/L): _____ pH: _____

Preparación de la disolución del IFA: _____

No.	Conc. (mg/L)	Abs.	CV%, S, Promedio
1			
2			
3			
4			
5			

ANEXO 2

Registro de datos primarios para la determinación de la Precisión.

Día # _____

Analista (Nombre y Firma): _____ Fecha: _____ pH: _____

Nombre del Fármaco: _____

Repetibilidad y/o Precisión intermedia				
Réplicas	Tiempo seleccionado (min)	Abs	CV%, S, Promedio	Intervalo de confianza
1				
2				
3				
4				

5				
6				

ANEXO 3

Registro de datos primarios para la determinación de la Exactitud.

Día #

Analista (Nombre y Firma): _____ Fecha: _____ pH: _____

Nombre del Fármaco: _____

Formula: Se calculará el por ciento de recobrado de la cantidad valorada con respecto a la cantidad conocida de analito añadida a la muestra

Conc.	Abs.	CV%, S, Promedio	% recobrado
Inferior			
Media			
Superior			

Anexo #5



INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de disolución para sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica. Comparación de perfiles de disolución.	PNO: I.12.004
	Hoja No: 060 de 8
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la realización de ensayos de disolución a pH 1.2, 4.5 y 6.8, de fármacos que sean sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica, genérico e innovador, que pertenezcan a la Clase I o Clase III según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB o BCS por sus siglas en inglés) y establecer la comparación entre los perfiles de disolución obtenidos.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable a los fármacos que sean sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica, Clase I o Clase III, según SCB y se realizarán en el Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

Los Técnicos del laboratorio de la UMEB y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

4.1 Utilice siempre la bata de laboratorio y los medios de protección personales necesarios según convenga.

4.2 Revise las fichas de seguridad de los reactivos que se incluyen en este PNO y preste especial atención a los efectos sobre la salud en cada una de ellas.

4.3 Utilice la campana de extracción siempre que se requiera, especialmente para los ácidos.

4.3 Durante el desarrollo de la técnica tenga en cuenta los aspectos de seguridad para cada uno de los equipos que se utilizan.

5 Equipamiento, materiales, reactivos y soluciones**5.1 Equipos**

- Balanza analítica
- Campana de extracción
- pHmetro
- Disolutor
- Centrífuga
- Espectrofotómetro UV-VIS
- Refrigerador

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de disolución para sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica. Comparación de perfiles de disolución.	PNO: I.12.004
	Hoja No: 061 de 8
	Edición: 1

5.2 Materiales

- Beakers de 75 y 2000 mL
- Matraces de 10 mL
- Jeringuillas de 10 mL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Micropipeta de 100-1000 μ L
- Pipeta graduada de 5 mL
- Espátula

5.3 Reactivos y disoluciones

- Acido clorhídrico (HCl), p.a.
- Cloruro de sodio (NaCl), p.a.
- Acetato de sodio ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$, NaAc), p.a.
- Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$, HAc), p.a.
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), p.a.
- Hidróxido de sodio (NaOH), p.a.
- Agua bidestilada
- Fármacos innovador y genérico en estudio

6 Operaciones preliminares

6.1 Preparación de la disolución Buffer pH 1.2 (medio de trabajo):

- 6.1.1 Pese con exactitud alrededor de 2 g de cloruro de sodio y disuélvalo en agua bidestilada.
- 6.1.2 Vierta la disolución anterior en un beaker de 2 L y añada 7 mL de ácido clorhídrico.
- 6.1.3 Adicione alrededor de 1 L de agua bidestilada y agite alrededor de 5 min para lograr una buena homogenización.
- 6.1.4 Mida el pH del medio de trabajo, ajuste el pH a 1.2 ($pH \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

6.2 Preparación de la disolución Buffer pH 4.5 (medio de trabajo):

- 6.2.1 Pese con exactitud alrededor de 5,5 g de acetato de sodio y disuélvalo en agua bidestilada.
- 6.2.2 Vierta la disolución anterior en un beaker de 2 L y añada 3 mL de ácido acético glacial.
- 6.2.3 Adicione alrededor de 1 L de agua bidestilada y agite alrededor de 5 min para lograr una buena homogenización.
- 6.2.4 Mida el pH del medio de trabajo, ajuste el pH a 4.5 ($pH \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

6.3 Preparación de la disolución Buffer pH 6.8 (medio de trabajo):

- 6.3.1 Pese con exactitud alrededor de 6,8 g de fosfato monobásico de potasio (hidrogeno fosfato de potasio) y 0,9 g de hidróxido de sodio.
- 6.3.2 Disuelva el fosfato monobásico de potasio y el hidróxido de sodio en agua bidestilada en un beaker de 2 L.

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de disolución para sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica. Comparación de perfiles de disolución.	PNO: I.12.004
	Hoja No: 062 de 8
	Edición: 1

6.3.3 Adicione alrededor de 1 L de agua bidestilada y agite alrededor de 5 min para lograr una buena homogenización.

6.3.4 Mida el pH del medio de trabajo, ajuste el pH a 6.8 ($\text{pH} \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

6.4 Preparación de la curva de calibración.

6.4.1 La curva se realizará con el Material de Referencia del Ingrediente farmacéutico Activo del fármaco en cuestión.

6.4.2 Se tomarán cinco puntos para hacer la curva, las concentraciones dependerán de la dosis del producto.

6.4.3 Se obtendrán las absorbancias a la longitud de onda de máxima absorción del IFA en el medio de trabajo (disolución buffer).

6.4.4 Se obtendrá la ecuación de la recta.

7 Procedimiento

7.1 Vierta 900 mL de la solución Buffer en cuestión en el vaso de disolución.

7.2 Encienda el equipo y establezca los parámetros de temperatura a 37 °C y velocidad de agitación a 75 s⁻¹

7.3 Active la opción de temperatura y espere a que se establezca (20 -25 min con el equipo cerrado y 35 min si está abierto).

7.4 Coloque el medicamento en el vaso de disolución con la solución buffer y active la velocidad de agitación de las paletas.

7.5 Los tiempos de muestreo serán de 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 min.

7.6 A esos tiempos tome una muestra de 5 mL, con la ayuda de una jeringuilla.

7.7 Deposite cada muestra en un tubo Falcon y anote el volumen.

7.8 Coloque las muestras a la centrifuga y centrifugue a 5000 s⁻¹ por espacio de 5 min.

7.9 Tome 1000 µL (1 mL) de cada muestra centrifugada y llévelo a un matraz de 10 mL y enrase con la solución Buffer de trabajo.

7.10 Obtenga la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción con que se realizó la curva de calibración.

7.11 Mida el pH final del medio de trabajo que quedó en el vaso de disolución.

Nota: Las muestras tomadas pueden congelarse y ser leídas en otro momento.

8 Cálculo e interpretación de los resultados

8.1 Determine la concentración perteneciente a cada absorbancia para cada tiempo ensayado mediante la curva de calibración previa.

8.2 Determine el porcentaje disuelto de fármaco para cada concentración obtenida y obtenga las curvas “% Disuelto vs tiempo” para cada fármaco.

8.3 Determine el valor medio del porcentaje del fármaco disuelto, la desviación estándar relativa (S) y el coeficiente de variación (CV%) en cada tiempo de muestreo con todas las curvas.

8.4 Compare los perfiles obtenidos para demostrar si hay similitud, mediante la ecuación siguiente:

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} * 100 \right\}$$

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de disolución para sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica. Comparación de perfiles de disolución.	PNO: I.12.004
	Hoja No: 063 de 8
	Edición: 1

Donde:

f_2 : es el factor de similitud.

n : es el número de puntos de muestreo en el tiempo.

R_t : es el promedio del % disuelto del producto de referencia en cada intervalo de tiempo.

T_t : es el promedio del % disuelto del producto a ensayar en cada intervalo de tiempo

Nota: Los cálculos se realizarán en un documento de Microsoft Office Excel 2007 previamente elaborado.

9 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

10 Requisitos de documentación

Llene correctamente los Registros de Uso y Cuidado de los Equipos, el Registro de datos primarios (Anexo 1, código I.12.004/1), así como cualquier registro vinculado con el desarrollo de esta técnica.

11 Referencias / Documentos aplicables

Son indispensables para la aplicación de este PNO, los procedimientos normalizados de operación de Funcionamiento y Cuidado de los equipos que se relacionan en 5.1, así como cualquier otro PNO relacionado con este Procedimiento.

12 Bibliografía

- Regulación No. 48/ 2007. *Requisitos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución en capsulas y tabletas de liberación inmediata.* CECMED. MINSAP. Ciudad de la Habana. Cuba.

Anexo 1

CBQ UNIDAD DE MODELACION Y EXPERIMENTACION BIOFARMACEUTICAS	<u>REGISTRO DE DATOS PRIMARIOS</u> Ensayo de disolución.	Código: I.12.T03/1
		Área: UMEB
		Página:

Nombre del producto:		No. Lote:	
Fecha de recepción:	pH de trabajo:	Innovador <input type="checkbox"/>	Genérico <input type="checkbox"/>
Nombre del Analista:		Firma:	

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de disolución para sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica. Comparación de perfiles de disolución.	PNO: I.12.004
	Hoja No: 064 de 8
	Edición: 1

PREPARACIÓN DE LA DISOLUCIÓN BUFFER		
Operaciones analíticas:		
No. Lote del agua destilada:		
Reactivos	Lote	Procedencia
Equipos utilizados	Código	Fecha:
Balanza analítica		
Campana de extracción		
pHmetro		

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #6



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de solubilidad por el método de Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.	PNO: I.12.T03
	Hoja No: 065 de 8
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la realización de ensayos de solubilidad a pH 1,2; pH 4,5; y pH 6,8.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable a los fármacos que sean sólidos orales de liberación inmediata con acción sistémica, Clase I o Clase III, según SCB y se realizarán en el Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

Los Técnicos del laboratorio de la UMEB y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

4.1 Utilice siempre la bata de laboratorio y los medios de protección personales necesarios según convenga.

4.2 Revise las fichas de seguridad de los reactivos que se incluyen en este PNO y preste especial atención a los efectos sobre la salud en cada una de ellas.

4.3 Utilice la campana de extracción siempre que se requiera, especialmente para los ácidos.

4.3 Durante el desarrollo de la técnica tenga en cuenta los aspectos de seguridad para cada uno de los equipos que se utilizan.

5 Equipamiento, materiales, reactivos y soluciones**5.1 Equipos**

- Balanza analítica (FCE.I.04.012)
- Campana de extracción (FCE.I.04.005)
- pH metro (FCE.I.04.026)
- Espectrofotómetro UV-VIS (FCE.I.04.010)
- Baño ultrasónico (FCE.I.04.006)
- Baño termostatzado (FCE.I.04.011)

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de solubilidad por el método de Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.	PNO: I.12.T03
	Hoja No: 066 de 8
	Edición: 1

5.2 Materiales

- Beakers de 75 y 2000 mL
- Matraces de 10 mL
- Jeringuillas de 10 mL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Micropipeta de 100-1000 μ L
- Pipeta graduada de 5 mL
- Espátula

5.3 Reactivos y disoluciones

- Acido clorhídrico (HCl), p.a.
- Cloruro de sodio (NaCl), p.a.
- Acetato de sodio ($C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$, NaAc), p.a.
- Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$, HAc), p.a.
- Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4), p.a.
- Hidróxido de sodio (NaOH), p.a.
- Agua bidestilada
- Fármacos innovador y genérico en estudio

6 Operaciones preliminares**6.1 Preparación de la disolución Buffer pH 1.2 (medio de trabajo):**

6.1.1 Pese con exactitud alrededor de 2 g de cloruro de sodio y disuélvalo en agua bidestilada.

6.1.2 Vierta la disolución anterior en un beaker de 2 L y añada 7 mL de acido clorhídrico.

6.1.3 Adicione alrededor de 1 L de agua bidestilada y agite alrededor de 5 min para lograr una buena homogenización.

6.1.4 Mida el pH del medio de trabajo, ajuste el pH a 1.2 ($pH \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

6.2 Preparación de la disolución Buffer pH 4.5 (medio de trabajo):

6.2.1 Pese con exactitud alrededor de 5,5 g de acetato de sodio y disuélvalo en agua bidestilada.

6.2.2 Vierta la disolución anterior en un beaker de 2 L y añada 3 mL de acido acético glacial.

6.2.3 Adicione alrededor de 1 L de agua bidestilada y agite alrededor de 5 min para lograr una buena homogenización.

6.2.4 Mida el pH del medio de trabajo, ajuste el pH a 4.5 ($pH \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

6.3 Preparación de la disolución Buffer pH 6.8 (medio de trabajo):

6.3.1 Pese con exactitud alrededor de 6,8 g de fosfato monobásico de potasio (hidrogeno fosfato de potasio) y 0,9 g de hidróxido de sodio.

6.3.2 Disuelva el fosfato monobásico de potasio y el hidróxido de sodio en agua bidestilada en un beaker de 2 L.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de solubilidad por el método de Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.	PNO: I.12.T03
	Hoja No: 067 de 8
	Edición: 1

6.3.3 Adicione alrededor de 1 L de agua bidestilada y agite alrededor de 5 min para lograr una buena homogenización.

6.3.4 Mida el pH del medio de trabajo, ajuste el pH a 6.8 ($\text{pH} \pm 0.5$) adicionando agua bidestilada.

7 Procedimiento

7.1 El principio activo se adiciona a 5 mL de cada medio hasta lograr la saturación.

7.2 Las muestras deben ser sonicadas y colocadas en el baño termostático por 24 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$

7.3 Al día siguiente, las muestras deberán ser diluidas y filtradas para ser analizadas en el UV

7.4 Obtenga la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción con que se realizó la curva de calibración.

Nota: Las muestras tomadas pueden congelarse y ser leídas en otro momento.

8 Cálculo e interpretación de los resultados

8.1 Determine la concentración perteneciente a cada absorbancia para cada tiempo ensayado mediante la curva de calibración previa.

8.2 Determine el porcentaje disuelto de fármaco para cada concentración obtenida y obtenga las curvas “% Disuelto vs tiempo” para cada fármaco.

8.3 Determine el valor medio del porcentaje del fármaco disuelto, la desviación estándar relativa (S) y el coeficiente de variación (CV%) en cada tiempo de muestreo con todas las curvas.

8.4 Compare los perfiles obtenidos para demostrar si hay similitud, mediante la ecuación siguiente:

$$D_o = \frac{M_o/V_o}{C_s}$$

D_o = Número de Dosis
 M_o = Dosis máxima
 V_o = Vol. Solvente (250 mL)
 C_s = Solubilidad mínima

Nota: Los cálculos se realizarán en un documento de Microsoft Office Excel 2007 previamente elaborado.

9 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

10 Requisitos de documentación

Llene correctamente los Registros de Uso y Cuidado de los Equipos, el Registro de datos primarios (Anexo 1, código I.12.T03/1), así como cualquier registro vinculado con el desarrollo de esta técnica.

11 Referencias / Documentos aplicables

Son indispensables para la aplicación de este PNO, los procedimientos normalizados de operación de Funcionamiento y Cuidado de los equipos que se relacionan en 5.1, así como cualquier otro PNO relacionado con este Procedimiento.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de solubilidad por el método de Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.	PNO: I.12.T03
	Hoja No: 068 de 8
	Edición: 1

13 Bibliografía

- Regulación No. 48/ 2007. *Requisitos para aplicar y/o diseñar un ensayo de disolución en capsulas y tabletas de liberación inmediata*. CECMED. MINSAP. Ciudad de la Habana. Cuba.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de solubilidad por el método de Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.	PNO: I.12.T03
	Hoja No: 069 de 8
	Edición: 1

CURVA DE CALIBRACIÓN		
Masa del producto (MR):	Longitud de onda:	Blanco:
No. Lote del MR:	Procedencia:	Fecha:
Operaciones analíticas:		
Vol. Alicuota (mL) / Vol. Disol. (mL)	Concentración (mg/L)	Absorbancia

ENSAYO DE DISOLUCIÓN			
Operaciones analíticas:			
pH final del medio de trabajo:		Volumen de muestra (mL):	Temperatura (°C):
Tiempo de centrifugación (min):		Velocidad de agitación (s⁻¹):	
No. tabletas	Tiempo de muestreo (min)	Absorbancia (Abs)	Concentración (mg/L)
1			

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Ensayo de solubilidad por el método de Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.	PNO: I.12.T03
	Hoja No: 070 de 8
	Edición: 1

Equipos utilizados	Código	Fecha:
Disolutor		
Centrífuga		
Espectrofotómetro UV-VIS		
Refrigerador		
Observaciones:		

Supervisado por:

Firma:

Fecha:

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #7



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad <i>in situ</i> en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 071 de 126
	Edición: 1

Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la realización de ensayos de permeabilidad *in situ* (método de perfusión en lazo cerrado), utilizando como modelo animal la rata Sprague Dawley.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable al desarrollo de estudios de permeabilidad *in situ* en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Términos y definiciones

A los fines de este documento se aplican los siguientes términos y definiciones:

°C	grados Celsius
cm	centímetros
c.s.p.	cantidad suficiente para
g	gramos
h	horas
kg	kilogramos
L	litros
M	molar
mL	mililitros
µL	microlitros
min	minutos
rpm	revoluciones por minuto

4 Responsabilidades

El Jefe de laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

5 Condiciones de seguridad

5.1 Utilice vestuario (batas) y medios de protección (guantes de látex) al manipular los animales de experimentación.

5.2 Durante el desarrollo de este PNO se debe tomar en consideración los aspectos de seguridad especificados para cada uno de los equipos que se utilizarán en el mismo.

5.3 La preparación de las diferentes soluciones, así como la aplicación de la anestesia se realizarán bajo campana.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad in situ en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 072 de 126
	Edición: 1

6 Animales, equipamiento, locales, materiales y reactivos

6.1 Animal de experimentación:

Se utiliza la rata Sprague Dawley macho con categoría higiénico-sanitaria aceptadas para este tipo de estudio, con edad comprendida entre 8 y 12 semanas y peso entre 250-295g. La alimentación en etapa de cuarentena es con pienso para ratas en forma de pellet suministrado por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio. El agua suministrada es “ad libitum” con calidad potable y previamente esterilizada.

**Se utilizan de 6-10 animales por dosis investigada.*

6.2 Equipamientos

- Baño de agua termostatzado (Ver PNO: FCE.I.04.011)
- Balanza técnica de plato (0-400g) (Ver PNO: FCE.I.04.013)
- Balanza analítica (0-210g) (Ver PNO:FCE.I.04.012)
- Espectrofotómetro UV-VIS (Ver PNO:FCE.I.04.010)
- Refrigerador (Ver PNO:FCE.I.04.014)
- Microcentrífuga (Ver PNO:FCE.I.04.016)
- Campana de extracción (Ver PNO:FCE.I.04.005)
- Bidestilador de Agua (Ver PNO:FCE.I.04.009)

6.3 Locales

La recepción y permanencia inicial de los animales (cuarentena de 5 días mínimo) se realiza en un cubículo para ratas ubicado en el bioterio del área biológica del CBQ. Las ratas se trasladan a la UMEB el día antes de comenzar el experimento.

6.4 Materiales

- Tubos Falcon de 25 mL (1 unidad por rata)
- Tubos *Eppendorf* para la recogida de muestras (6 unidades por rata)
- Pipetas de 20, 200 y 1000 µL
- Cánulas de vidrio acodadas (3 x 4 mm, 2 unidades por rata)
- Tubos de polietileno (3 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno, 2 unidades por rata)
- Llaves de 3 pasos (2 unidades por rata)
- Jeringuillas de vidrio con luer-lock de 10 mL de capacidad (2 unidades por rata)
- Algodón hidrófilo
- Hilo de seda
- Pinzas de diente ratón
- Pinzas de punta fina
- Tijera quirúrgica

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad in situ en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 073 de 126
	Edición: 1

- Pinzas de sujeción unidas a soportes verticales (2 unidades por rata)
- Cajas T₂ de policarbonato para animales de laboratorio (1 por rata)
- Rejillas tapas con sus pomos/tetinas (1 por caja/rata)
- Piense peletizado para ratas
- Pijama/bata sanitaria
- Guantes quirúrgicos de látex
- Lámpara de calor con bombillo incandescente de 40 watt

6.5 Reactivos y soluciones

- Solución de anestesia: Uretano en suero fisiológico.
- Suero fisiológico.
- NaCl (Sigma-Aldrich, >99.5%)
- KCl (Sigma-Aldrich, >99.5%)
- CaCl₂.2H₂O (Sigma-Aldrich, >99%)
- NaH₂PO₄.2H₂O (Sigma-Aldrich, ppa, >99%)
- Na₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, >99%)
- H₂O bidestilada
- Éter etílico (Sigma-Aldrich, >99%)
- Uretano (Sigma-Aldrich, >99%)
- NaOH (Sigma-Aldrich, grado reactivo, >98%)
- HCl (ACS, 37%)

7 Operaciones preliminares**7.1 Preparación de las soluciones de lavado A y B:**

- Solución A: NaCl.....9 g
KCl.....0.34 g
CaCl₂.2H₂O.....0.19 g
NaH₂PO₄.2H₂O.....0.76 g
H₂O bidestilada.....c.s.p 1L
- Solución B: NaCl.....9 g
NaH₂PO₄.2H₂O 1/15M.....3.9 mL
Na₂HPO₄1/15M 6.1 mL
H₂O bidestilada.....c.s.p.1L

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad in situ en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 074 de 126
	Edición: 1

7.2 Preparación de soluciones stocks de:

NaH₂PO₄·2H₂O 1/15M (0.067M)

Na₂HPO₄ 1/15M (0.067M)

**Estas soluciones se almacenan a +4C y se pueden usar por 6 meses.*

7.3 Solución anestésica:

Para la intervención quirúrgica previa a los ensayos de perfusión *in situ*, se requiere una anestesia general profunda del animal. Se recomienda utilizar el siguiente anestésico por vía i.p.

i- Uretano al 25% (m/V) en agua destilada, administrada a la dosis de 0.4 mL por cada 100 gramos de peso corporal. Para la perfecta disolución del uretano es aconsejable calentar ligeramente el agua durante la preparación de la solución anestésica. Esta solución tiene un periodo de validez máximo de una semana si se conserva a una temperatura de 4°C.

**Se recomienda pesar todas las ratas y calcular las dosis de anestésico previamente.*

7.4 Preparación de la solución de fármaco:

- Disolución del fármaco en “solución B”. Ajustar el pH a 7,00 antes de enrasar (con NaOH o HCl).

7.5 Organizar el área quirúrgica: Se coloca a disposición del técnico los materiales imprescindibles para la preparación de la rata, la canulación del segmento intestinal y la recogida de la información primaria.

- Tabla de disección
- Cánulas de vidrio.
- Instrumentos de cirugía general y especial.
- Hilo de seda de 20 cm (3)
- Algodón y lámpara de bombillo incandescente.

8. Procedimiento

8.1 Acondicionamiento del animal

La rata se mantiene en ayuno durante un periodo de unas 20 horas, con el objetivo de que la cantidad de *detritus* y *heces formes* sea mínima en el lumen intestinal. Durante ese periodo de ayuno se le permite a la rata el libre acceso al agua para evitar su deshidratación.

8.2 Anestesia del animal

Para reducir el estrés y facilitar el pesaje del animal es conveniente anestesiarlo ligeramente. Para ello se coloca al animal en una atmósfera saturada de éter etílico. La inyección de la anestesia se realiza cuando el animal ha recuperado el reflejo del enderezamiento, con el fin de evitar la suma de los efectos depresores de ambos anestésicos. Se pesa el animal en una balanza técnica de plato, según PNO FCE.I.04.013. La anestesia se inducirá con uretano al 25% (m/V) en agua destilada, administrada por vía intraperitoneal a la dosis de 0.4 mL por cada 100 gramos de peso corporal. El grado de anestesia profunda necesario para el inicio de la intervención quirúrgica se alcanza 45 minutos tras la administración.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad in situ en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 075 de 126
	Edición: 1

8.3 Administración intraperitoneal de la anestesia. Se sujeta el animal y se realiza un giro de forma tal que al suspenderlo la parte ventral quede hacia arriba y la anterior (la cabeza) quede en un plano inferior en unos 45° aproximadamente, permitiendo el descenso de los órganos abdominales y evitando que al introducir la aguja haga contacto con algún órgano. La aguja (calibre 23-25) se introduce en el abdomen próximo a la línea alba. Se recomienda tener precaución después de introducida la aguja y antes de aplicar el contenido para no aplicarlo intra-gastrointestinal, por lo que se extrae ligeramente la aguja en su penetración inicial y se mueve suavemente el bisel en la cavidad peritoneal. Tras la inyección se efectúa un ligero masaje en la zona administrada para facilitar la difusión del anestésico y su paso a la circulación general. Luego, el animal se coloca bajo una lámpara de calor, ya que la anestesia provoca relajación muscular generalizada y puede llevar a la hipotermia.

8.4 Comprobación de la profundidad de la anestesia. Se evalúa la pérdida de sensibilidad evaluando reflejo palpebral, hasta alcanzar el periodo III de anestesia profunda (quirúrgico).

8.5 Técnica quirúrgica

A partir de este momento el animal debe mantenerse a una temperatura ambiental de 25°C para evitar que se enfríe, ya que se podría modificar la perfusión sanguínea y falsear los resultados del ensayo de absorción.

Se coloca la rata en posición de cúbito supino sobre la tabla de disección y se inmoviliza por las extremidades con cinta adhesiva, de forma que no adquiera una posición forzada. De entenderse pertinente por el investigador se puede fijar la cinta adhesiva a la tabla de disección con agujas de entomología. Con ayuda de unas pinzas de diente de ratón y con una tijera de punta roma, se hace una incisión longitudinal en la línea alba de la capa muscular abdominal del animal. Para descubrir la cavidad abdominal se corta a lo largo de esta línea desde 2 cm por encima del poro genital hasta 1 cm por debajo del apéndice xifoides, evitando lesionar los músculos abdominales y tratando de producir la mínima hemorragia posible.

Una vez abierta la cavidad abdominal se localiza el estómago para identificar el duodeno (primer tramo del intestino delgado), se busca el conducto biliar y se liga con hilo de seda para impedir el paso de la bilis al lumen intestinal y la aparición de un posible ciclo entero-hepático. En la zona proximal del duodeno, se realiza un pequeño corte en bisel y se introduce una cánula de vidrio acodada, la cual se sujeta con hilo de seda a la pared intestinal. El otro extremo de la cánula se conecta, mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo *Stopcock* (ver Figura 1). A su vez, ésta encaja a rosca con una jeringa de 10 mL de capacidad que se sujeta con una pinza a un soporte vertical. La posición de la cánula debe respetar, mientras sea posible, la disposición natural del intestino. La llave de tres pasos permite la correcta realización de los ensayos.

Para aislar el intestino delgado se localiza el ciego, tramo donde acaba el intestino delgado y empieza el intestino grueso, y se efectúa una incisión de forma que se proceda sin dificultad a la limpieza de la mucosa. Para que el ensayo de absorción sea reproducible, se debe evitar toda obstrucción en las cánulas. Es necesario que la mucosa intestinal quede totalmente libre de residuos y de las sales biliares, que actuarían como tensoactivos. Aunque el animal ha sido sometido a 20h de ayuno, siempre quedan restos de quimo en el lumen intestinal, por lo que es necesario proceder al lavado de la zona. Primero se pasa la solución de lavado A (aproximadamente 50 mL, atemperado a 37°C) y luego la solución de lavado B (aproximadamente 50 mL, atemperado a 37°C), para restaurar el pH intestinal. Debe evitarse el lavado enérgico ya que se podría lesionar la mucosa intestinal. Una vez finalizado el lavado, se hace una segunda incisión y se coloca una cánula de forma similar a la primera. Una vez ligada la cánula con hilo de seda se introduce varias veces aire en el intestino para provocar la salida de los restos de la solución de lavado B, aunque siempre queda un volumen residual aproximadamente de 0.7 mL. Así se evita, en lo posible, la dilución de la solución de perfusión. La cánula se une a una llave de tres pasos y ésta, a su vez, a una jeringa de 10 mL que se sujeta por una pinza a un soporte vertical. Durante el proceso de lavado hay que evitar ejercer una excesiva presión sobre el émbolo para no dañar la mucosa

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad in situ en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 076 de 126
	Edición: 1

intestinal y no alterar la perfusión sanguínea, factores que de ser modificados, podrían condicionar cambios en la constante de absorción de las sustancias ensayadas.

Una vez finalizado el lavado, se hace una segunda incisión y se coloca una cánula de forma similar a la primera. Una vez ligada la cánula con hilo de seda se introduce varias veces aire en el intestino para provocar la salida de los restos de la solución de lavado B, aunque siempre queda un volumen residual aproximadamente de 0.7 mL. Así se evita, en lo posible, la dilución de la solución de perfusión. La cánula se une a una llave de tres pasos y ésta, a su vez, a una jeringa de 10 mL que se sujeta por una pinza a un soporte vertical. Durante el proceso de lavado hay que evitar ejercer una excesiva presión sobre el émbolo para no dañar la mucosa intestinal y no alterar la perfusión sanguínea, factores que de ser modificados, podrían condicionar cambios en la constante de absorción de las sustancias ensayadas.

Dado que la cavidad abdominal permanece al descubierto, para evitar la desecación del intestino, se introduce en ella un pequeño volumen de líquido de solución B, atemperado a 37°C, y se cubre la incisión con una torunda de algodón empapado en la misma. Conviene controlar que no se enfríe la cavidad abdominal durante el ensayo, ya que podría disminuir el riego mesentérico y conllevar a una disminución en la velocidad de absorción. Esto se consigue reponiendo la torunda varias veces, evitándose una deshidratación que pudiera incrementar la reabsorción de agua y por lo tanto, aumentar la concentración de la solución perfundida.

▷ *Jeringa-exterior*

Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al exterior.



▷ *Jeringa-intestino*

Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al intestino o viceversa.



▷ *Intestino-exterior*

Permite el paso de solución o aire desde el intestino al exterior.



Figura 1. Funcionamiento de la llave de tres pasos.

8.6 Perfusión y toma de muestra

La solución del compuesto a ensayar, atemperada a 37°C, se coloca en la jeringa proximal. Se utiliza un volumen de 10 mL de solución si se trata de un ensayo en intestino delgado completo; 5 mL si el ensayo se realiza en colon, yeyuno o íleon y 2 mL si el ensayo se realiza en el duodeno. La llave de tres pasos se mantiene en posición intestino-exterior (Ver figura 1). Luego, la llave distal se coloca en posición intestino-exterior y la llave proximal en posición jeringa-intestino.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad in situ en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 077 de 126
	Edición: 1

Se introduce la solución en el intestino presionando ligeramente el émbolo de la jeringa proximal. De este modo, el aire contenido en dicha cavidad es desplazado al exterior sin provocar una distensión excesiva de la pared intestinal. Se colocan ambas llaves en posición jeringa-exterior y el intestino se convierte en un compartimento estanco. En este momento se pone en marcha el cronómetro. La toma de muestras se realiza cada 5 minutos alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se toma por la jeringa distal y la última, por la proximal. Se recoge un total de seis muestras (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) de 400 μ l de solución cada una, excepto en el ensayo de duodeno, en el que el volumen de muestra es 200 μ l.

Para extraer la muestra, se colocan las dos llaves en posición jeringa-intestino. Se toma aire con la jeringa opuesta al muestreo y se introduce en el intestino a la vez que la solución asciende por la otra jeringa. A continuación se toma la muestra mientras se mantiene presionada la cavidad abdominal. Se vuelve a introducir la solución en el intestino mientras la jeringa opuesta comunica el lumen intestinal con el exterior. Simultáneamente, se recoge cualquier líquido que sea arrastrado con el aire que se desplaza al exterior. De esta forma se puede estimar la variación del volumen remanente en el intestino durante el ensayo. Una vez introducida la solución, se colocan las llaves en posición jeringa-exterior y se transforma, de nuevo, el intestino en un compartimento estanco.

Las muestras se recogen en tubos *Eppendorf* de 1,5 mL, se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos para separar la muestra de restos de mucosa. A continuación se conservan de forma adecuada hasta la valoración cuantitativa. Después de tomar la última muestra se lleva a cabo el ensayo de reabsorción de agua. Para ello, se desconecta la cánula de la jeringa íleo-cecal y se coloca en un tubo Falcon de 25 mL. Con la jeringa que queda conectada, se toma aire y se ejerce presión para extraer el líquido remanente a través de la cánula. Seguidamente se corta, con ayuda de unas tijeras, el mesenterio y se separa el asa intestinal del resto del animal. Una vez aislado el intestino, se presiona desde el principio hasta el final, con ayuda de un algodón húmedo, asegurando que se vacíe completamente. Finalizado el ensayo, el animal se sacrifica mediante dislocación cervical.

El volumen recogido se centrifuga durante 5 minutos a 5000 r.p.m. De esta forma sedimentan en el tubo de muestra los restos de mucosa que se han arrastrado. Se retira el residuo y se mide el sobrenadante. A continuación se conservan de forma adecuada hasta la valoración cuantitativa.

Para calcular el volumen final (V_f), a este valor se adiciona el volumen recogido durante la toma de muestras y el de las muestras extraídas. Para los cálculos posteriores se emplea como volumen inicial (volumen a tiempo cero, V_0) 10,7 mL. Finalmente se comprueba el pH de la solución final, dada su importancia en el grado de ionización de las sustancias y, por lo tanto, en su absorción.

8.7 Análisis de las muestras

Las muestras biológicas se centrifugan a 8000 r.p.m. durante 8 minutos. De este modo se obtiene un sobrenadante que contiene en disolución el compuesto ensayado y un sedimento sólido (restos de mucosa), que podrían alterar la valoración. Por lo tanto, sólo se cuantifica el sobrenadante. El análisis específico de la muestra constituye el objeto de otro PNO y depende de los analitos a evaluar.

9 Cálculo e interpretación de los resultados

Una vez valoradas las muestras se procede al cálculo de las concentraciones y cantidades de analito en las muestras, y posteriormente se realiza el análisis de los resultados.

9.1 Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada de modo que la solución remanente en lumen se concentra. Este proceso puede falsear por exceso el valor de la concentración remanente en lumen, sobre

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad in situ en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 078 de 126
	Edición: 1

todo en las últimas muestras (25 y 30 min). Con el fin de estimar las concentraciones reales de compuesto se calcula el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. Dado que el volumen varía según una cinética de orden cero, la ecuación diferencial representativa del proceso es:

$$\frac{dV}{dt} = -k_0 \quad [.1]$$

Su forma integrada es:

$$V = V_0 - k_0 \cdot t \quad [.2]$$

en la que V es el volumen remanente en el intestino a cada tiempo, V_0 es el volumen remanente a tiempo inicial y k_0 representa la constante de velocidad de reabsorción de agua (mL/min). K_0 es la pendiente de la regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes tiempo cero (10,7 mL) y el valorado a los 30 minutos (final del ensayo). Así, se pueden calcular los volúmenes remanentes teóricos para cada tiempo de toma de muestra (V_t) y con ellos se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto mediante la siguiente expresión:

$$C = E \cdot \frac{V_t}{V_0} \quad [.3]$$

en la que C corresponde a la concentración de soluto corregida y E es la concentración obtenida experimentalmente.

9.2 Cálculo de la constante aparente de velocidad de absorción.

Se considera que la desaparición del compuesto desde el lumen se debe únicamente a absorción y sigue una cinética aparente de primer orden según la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = -k_a \cdot C \quad [.4]$$

donde C corresponde a la concentración remanente de fármaco en el intestino y k_a la constante de velocidad de absorción aparente de primer orden. Su forma integrada es:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad [.5]$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t = 0$).

La regresión por mínimos cuadrados proporciona los valores de C_0 y k_a , que sirven como estimas iniciales para el ajustado no lineal posterior. Una vez obtenido el valor definitivo de k_a se calcula la permeabilidad, P_{ef} , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$P_{ef} = r \cdot \frac{k_{ap}}{2}, \text{ donde } r \text{ es el radio efectivo intestinal, obtenido a partir del volumen de solución perfundido y de la longitud del tramo}$$

intestinal ensayado. Por esta razón, la toma de muestra se inicia a ese tiempo. Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realiza en un mínimo de 6 animales para cada concentración ensayada. Tras esto se obtiene un valor medio que se considera característico de las condiciones del ensayo.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Yaidel Quiñones García.	Aprobado por: Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 16-05-2016	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Permeabilidad <i>in situ</i> en ratas Sprague Dawley (método de perfusión en lazo cerrado).	PNO: I.12.T02
	Hoja No: 079 de 126
	Edición: 1

10 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

11 Requisitos de documentación

- Registro de datos para estudios de permeabilidad *in situ* (Anexo 1)

12 Bibliografía

- 1- Doluisio JT, Billups HF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV. Drug absorption. I. An *in situ* rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci* 1969; 58:1196-1200.
- 2- Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB, Hogben CAM. Absorption of drugs from rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1958; 123: 81-88.

13 Anexos

Anexo 1

REGISTRO DE DATOS PARA ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD *IN SITU*

CBQ INVESTIGACIONES			Registro de datos para estudios de permeabilidad <i>in situ</i>											Código:L00.012/1		
														Área: UMEB		
														Página:		
Fecha	No. Animal	Peso (g)	Anestésico dosis	Producto/trabajo	V _i (mL)	V _{um} (mL)	V _m (mL)	V _r (mL)	K ₀	T _m (min)	C _{exp}	V _c (mL)	C _c	K _a (h ⁻¹)	P _{eff} (cm/s)	Observaciones
							0.4	(1)	(2)	5		(3)				
							0.4			10						
							0.4			15						
							0.4			20						
							0.4			25						
							0.4			30						

Anexo #8



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de la Balanza Analítica.	PNO: FCE.I.04.012
	Hoja No: 080 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento y cuidado de la balanza.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para el uso de la balanza ubicado en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El jefe de laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El jefe de laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

El Técnico es el responsable de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

4.1 Coloque la balanza sobre una base estable y plana.

4.2 No la exponga a condiciones extremas de calor, humedad, choques, luz solar y corrientes de aire.

4.3 No la exponga a vibraciones durante su funcionamiento.

4.4 Protegerla contra emanaciones químicas agresivas.

4.5 Coloque el nivel de la balanza en la posición centrada.

4.6 Se recomienda dejar la balanza conectada a la red, de lo contrario se deberá necesitar un tiempo mínimo de calentamiento de 30 minutos antes de comenzar a trabajar.

5 Operaciones preliminares

5.1 Se realiza la auto calibración del equipo a través de la tecla CAL.

Se deja constancia en el Registro de Uso y Limpieza de la Balanza.

5.2 Se recomienda dejar la balanza conectada a la red, a no ser que exista algún problema, en este caso se deja constancia en el registro de uso y limpieza del equipo.

6 Procedimiento

6.1 Presione la tecla de encendido de la balanza.

6.2 Espere el cero en el display.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 14-01-20	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de la Balanza Analítica.	PNO: FCE.I.04.012
	Hoja No: 081 de 0126
	Edición: 1

6.3 Para la calibración se procede según operación preliminar.

6.4 Coloque el recipiente en que va a pesar la muestra en el plato de la balanza.

6.5 Presione una de las teclas Tare y aparecerá cero en el display.

6.6 Pese la cantidad de muestra deseada.

6.7 Lea la pesada indicada después que la unidad (g) de pesada aparezca estable en el display. Retire la muestra pesada.

6.8 Presione la tecla para el apagado de la balanza, al finalizar el día de trabajo.

7 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

8 Observaciones

8.1 Datos del equipo:

- Marca: DENVER INSTRUMENT.
- Modelo: PI-214.
- País: Alemania.
- Serie: 28450240

8.2 Características técnicas y metrológicas:

- Voltaje: 110 -240V.
- Frecuencia: 50/60 Hz.
- Capacidad de pesada: (0 a 210) g.
- Legibilidad: 0,1 mg.
- Rango de medición: 0 hasta 210 g.
- Repetibilidad: 0,1 mg.
- Desviación de linealidad: 0,2 mg.
- Tiempo de estabilización: 3 seg.
- Dimensiones plato de carga: 79 mm.

8.3 En el display pueden aparecer toda una serie de mensajes que significan problemas en el trabajo con la balanza o de funcionamiento de la misma. Las causas y las soluciones a estos mensajes pueden ser consultadas en el Manual del Equipo en la página 74, Mensajes de Error.

8.4 Las teclas F y CF sólo se utilizarán para la pesada automática de animales. La tecla para la impresión de datos no está activada.

8.5 Limpieza del equipo

8.5.1 Para realizarla es necesario desconectar la balanza de la red y consiste en retirar el plato de la balanza y limpiarlo cuidadosamente con un algodón, esponja o paño fino humedecido en alcohol o disolución de un detergente de uso doméstico

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 14-01-20	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de la Balanza Analítica.	PNO: FCE.I.04.012
	Hoja No: 082 de 0126
	Edición: 1

común y secarlo bien, al igual que la base que también es de acero inoxidable. La parte exterior de la balanza y las puertas se limpian con un paño húmedo o ligeramente húmedo. La limpieza de este equipo se extiende a la mesa en que se encuentra ubicado. Se realiza semanal o en caso de derrames u otra eventualidad.

8.5.2 La limpieza que le realiza al equipo el personal técnico deja evidencia en el Registro de Uso y limpieza del equipo FCE.I.04.012/1.

8.6 Mantenimiento técnico

8.6.1 El mantenimiento técnico al equipo está contratado por el Centro, se realiza según el Plan de Mantenimiento. Se registra en las Tarjetas AT-5.

8.7 Verificación al equipo

8.7.1 La verificación está contratada por el Centro y se realiza según el Plan de Verificación y/o calibración M.02.007/2. Se deberán archivar los certificados de verificación y/o calibración.

9 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Uso de la Balanza cuando se realiza la calibración de la balanza o cualquier otra actividad, código FCE.I.04.012/1, Anexo 1.

10 Referencia/ documentos aplicables

El siguiente documento es indispensable para la aplicación de este PNO:

- Plan de Mantenimiento.
- Plan de Verificación y/o Calibración m.02.007/2

11 Bibliografía

- Manual del Equipo.

Anexo 1

Registro de Uso y Limpieza de la Balanza Analítica

CBQ INVESTIGACIONES.	REGISTRO DE USO Y LIMPIEZA DE LA BALANZA ANALÍTICA	Código: FCE.I.04.012/1	
		Área: UMEB	
		Página:	
Fecha	Producto / Trabajo	Nombre	Observaciones

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 14-01-20	Firma: Fecha:

Anexo #9



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo de Equipo del Balanza Analítica.

Código: IT.FCE.I.04.012

Procedimiento

6.1 Presione la tecla de encendido de la balanza.

6.2 Espere el cero en el display.

6.3 Para la calibración se procede según operación preliminar.

6.4 Coloque el recipiente en que va a pesar la muestra en el plato de la balanza.

6.5 Presione una de las teclas Tare y aparecerá cero en el display.

6.6 Pese la cantidad de muestra deseada.

6.7 Lea la pesada indicada después que la unidad (g) de pesada aparezca estable en el display. Retire la muestra pesada.

6.8 Presione la tecla para el apagado de la balanza, al finalizar el día de trabajo.

Elaborado por: Mcs. Tania Betancourt Purón.		Revisado por: Mcs. Neyda Díaz Machado		Aprobado por: Dr. C. Miguel Angel Cabrera Pérez	
Firma: 19	Fecha: 13-09-	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:

Anexo #10



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIÓN

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de la Balanza de Plato.	PNO: FCE.I.04.013
	Hoja No: 084 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento y cuidado de la balanza.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para el uso de la balanza ubicado en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe de Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe de laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

El Técnico es el responsable de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad.

4.1 Coloque la balanza sobre una base estable y plana.

4.2 No la exponga a condiciones extremas de calor, humedad, choques, luz solar y corrientes de aire.

4.3 No la exponga a vibraciones durante su funcionamiento.

4.4 Protegerla contra emanaciones químicas agresivas.

4.5 Coloque el nivel de la balanza en la posición centrada.

4.6 Dejar la balanza siempre conectada a la red. De lo contrario necesita un tiempo de calentamiento previo mínimo de 30 minutos.

5 Procedimiento.

5.1 Presione la tecla de encendido de la balanza.

5.2 Espere el cero en el display.

5.3 Calibración

Cuando en el display aparece el cero, presione CAL y se activa la función de calibración.

Se deja constancia en el Registro de Uso y Limpieza de la Balanza.

NOTA: Durante la calibración el plato de la balanza se ajusta a los cambios en las condiciones ambientales. Se debe calibrar la balanza en el lugar de su instalación, después de cada período de tiempo sin utilizar, al realizar la primera medición del día, cuando se cambie de área o cuando haya cambio de condiciones ambientales (especialmente temperatura).

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-12-03	Firma:
	Fecha:	Firma:
		Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de la Balanza de Plato.	PNO: FCE.I.04.013
	Hoja No: 085 de 0126
	Edición: 1

5.4 Coloque el recipiente en que va a pesar la muestra en el plato de la balanza.

5.5 Presione una de las teclas Tare y aparecerá cero en el display.

5.6 Pese la cantidad de muestra deseada.

5.7 Lea la pesada indicada después que la unidad (g) de pesada aparezca estable en el display. Retire la muestra pesada.

5.8 Presione la tecla para el apagado de la balanza, al finalizar el día de trabajo.

6 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías realizadas o auto inspección.

7 Observaciones

7.1 Datos del equipo:

- Marca: DENVER.
- Modelo: PI-403.
- País: Alemania. (transformador Taiwán).
- Serie: 25501971.

7.2 Características técnicas y metrológicas:

- Voltaje: 110 -240V.
- Frecuencia: 50/60 Hz.
- Capacidad máxima: 400 g.
- Rango de medición: 0g a 400g
- Escalón real: 0,001 g.
- Escalón verificación: 0,01 mg.
- Alcance mínimo: 0,02 g.
- Tiempo de estabilización: 3 seg.
- Dimensiones plato de carga: 114 mm.

NOTA: En el display pueden aparecer toda una serie de mensajes que significan problemas en el trabajo con la balanza o de funcionamiento de la misma. Las causas y las soluciones a estos mensajes pueden ser consultadas en el Manual del Equipo en la página 74, Mensajes de Error. Las teclas F y CF sólo se utilizarán para la pesada automática. La tecla para la impresión de datos no está activada.

7.3.1 Procedimiento de Limpieza.

7.3.1.1 Desconecte la balanza de la red.

7.3.1.2 Retire el plato de la balanza.

7.3.1.3 Limpie cuidadosamente el plato y la base con un algodón, esponja o paño fino humedecido en alcohol o disolución de un detergente de uso doméstico común y sécalo bien.

7.3.1.4 Limpie con un paño húmedo o ligeramente húmedo la parte exterior y las puertas.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-12-03	Firma:
	Fecha:	Firma:
		Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de la Balanza de Plato.	PNO: FCE.I.04.013
	Hoja No: 086 de 0126
	Edición: 1

7.3.1.5 Limpie la mesa en que se encuentra ubicado.

7.4 Mantenimiento técnico

El mantenimiento técnico al equipo está contratado por el Centro, deberá realizarse de acuerdo al Plan de Mantenimiento. Se deberá registrar en las tarjetas AT-5.

7.5 Verificación al equipo

La verificación al equipo está contratado por el Centro, se deberá realizar de acuerdo al Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2. Se deberán archivar los certificados de verificación y/o calibración.

El equipo siempre se deja limpio cuando se termina de trabajar.

8 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Uso y Limpieza de la Balanza cuando se realiza la calibración de la balanza o cualquier otra actividad, código FCE.I.04.013/1, Anexo 1.

9 Referencia/ documentos aplicables

El siguiente documento es indispensable para la aplicación de este PNO:

- Plan de Mantenimiento.
- Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2

10 Bibliografía

- Manual del Equipo.

Anexo 1

Registro de Uso y Limpieza de la Balanza de Plato.

CBQ INVESTIGACIONES.		REGISTRO DE USO Y LIMPIEZA DE LA BALANZA DE PLATO.		Código: FCE.I.04.013/1
				Área: UMEB
				Página:
Fecha	Producto / Trabajo	Nombre	Observaciones	

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-12-03	Firma: Fecha:

Anexo #11



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo de Equipo de la Balanza de Plato **Código:** IT.FCE.04.013

Procedimiento.

5.1 Presione la tecla de encendido de la balanza.

5.2 Espere el cero en el display.

5.3 Calibración

Cuando en el display aparece el cero, presione CAL y se activa la función de calibración.

Se deja constancia en el Registro de Uso y Limpieza de la Balanza.

NOTA: Durante la calibración el plato de la balanza se ajusta a los cambios en las condiciones ambientales. Se debe calibrar la balanza en el lugar de su instalación, después de cada período de tiempo sin utilizar, al realizar la primera medición del día, cuando se cambie de área o cuando halla cambio de condiciones ambientales (especialmente temperatura).

5.4 Coloque el recipiente en que va a pesar la muestra en el plato de la balanza.

5.5 Presione una de las teclas Tare y aparecerá cero en el display.

5.6 Pese la cantidad de muestra deseada.

5.7 Lea la pesada indicada después que la unidad (g) de pesada aparezca estable en el display. Retire la muestra pesada.

5.8 Presione la tecla para el apagado de la balanza, al finalizar el día de trabajo.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-10-09	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #12



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del pHmetro.	PNO: FCE.I.04.026
	Hoja No: 088 de 126
	Edición: 2

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento y cuidado del pHmetro.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para la puesta en funcionamiento y cuidado del pHmetro ubicado en el Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente. El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO. Los Técnicos del laboratorio en cuestión y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Procedimiento para el funcionamiento del equipo**4.1 Generalidades**

4.1.1 Este pHmetro está diseñado con sondas (electrodos) para medir valores de pH en un amplio rango y además diversos parámetros del agua. Mide ORP (mV) o la temperatura. Los datos se pueden guardar y transferir a una impresora o PC.

4.2 Operaciones preliminares

4.2.1 Realice una inspección visual y cerciórese que el equipo esté limpio.

4.2.2 Asegúrese de que los electrodos se encuentren conectados al equipo antes de encenderlo.

4.2.3 Asegúrese que el equipo posea el conector del adaptador correcto para la toma de alimentación de la corriente.

4.2.4 Conecte a la fuente de 220 V.

4.2.5 Para encender o apagar el equipo oprima el botón  (ON/OFF) que aparece frente a usted.

4.2.6 Cuando termine de usar el equipo, primero apáguelo y luego desconéctelo de la corriente.

4.3 Procedimiento para el trabajo con los electrodos**4.3.1 Generalidades**

4.3.1.1 Para activar el electrodo por vez primera, si es un electrodo sellado (no rellenable), remueva la cubierta protectora del electrodo, enjuague el bulbo con agua destilada, agítelo suavemente (como si fuera un termómetro clínico) para remover las burbujas de aire, coloque el electrodo en la solución de acondicionamiento por al menos dos horas y conéctelo al equipo para su uso.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:



INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del pHmetro.	PNO: FCE.I.04.026
	Hoja No: 089 de 126
	Edición: 2

4.3.1.2 Si al retirar la cubierta protectora el electrodo se halla cubierto de un depósito calcáreo utilice HCl 0.1 N, de otra manera use los agentes limpiadores adecuados según manual página 77, después enjuáguelo con agua destilada y séquelo con cuidado con un papel de filtro.

4.3.1.3 Antes de usar el electrodo en una muestra de pH desconocido, enjuáguelo con agua bidestilada y cámbrelo en una o varias soluciones buffer de pH conocido, luego enjuague y coloque la punta del electrodo dentro de la muestra agitando esta suavemente para homogenizar y estabilizar la lectura. Para facilitar y acelerar las lecturas el electrodo debe “ambientarse” con la solución muestra, es decir, se debe enjuagar con algunas gotas de la muestra antes de sumergir en ella.

4.3.1.4 Para alargar la vida del electrodo, cada semana colóquelo en una solución 2M de NaOH durante 15 minutos y enjuague con agua destilada, luego colóquelo en una solución 2M de HCl por 15 minutos, lávelo con una solución jabonosa tibia y enjuague abundantemente con agua destilada. Después colóquelo en la solución de acondicionamiento o buffer de pH 7.0 al menos dos horas antes de usarse de nuevo.

4.3.1.5 Mientras el electrodo no se esté empleando manténgalo en la solución de acondicionamiento. Para cada marca o modelo hay una solución específica, pero si no se tiene a la mano se puede emplear un buffer adecuado. Nunca emplee agua destilada o desionizada, esto acorta la vida del electrodo. Algunos electrodos poseen un protector del bulbo de vidrio, pero esto no implica que este no pueda dañarse.

4.3.1.6 Cada electrodo trabaja en condiciones óptimas dentro de un rango específico de temperatura, por arriba o debajo de esta temperatura los electrodos presentan un error. Evite las altas temperaturas, los ácidos y las bases fuertes, pues aumentan las reacciones electroquímicas, condiciones que aceleran el envejecimiento del electrodo.

4.3.1.7 Si el electrodo se emplea con soluciones ricas en proteínas o grasas lávelo adecuadamente de lo contrario el tiempo de lectura se retardará y las lecturas no serán exactas. Por ello, enjuague con agua hasta remover la totalidad de la muestra. Si no es posible remover la materia orgánica prepare una disolución de detergente no abrasivo (como los empleados para lavar platos) en agua tibia y agitar suavemente el electrodo en dicha solución. Nuevamente enjuague con abundante agua tibia y luego enjuague brevemente con agua destilada y finalmente con la siguiente muestra o con la solución de acondicionamiento si no se va a usar durante un tiempo corto (algunos días, hasta una semana).

4.3.1.8 No permita que la punta del electrodo se seque a menos que se vaya a almacenar por un período prolongado de tiempo (más de una semana), de ser así enjuague perfectamente el electrodo con agua destilada, séquelo por contacto con papel libre de pelusa y cúbralo con su tapa protectora (seca) hasta que se emplee de nuevo. Antes de volver a usar, acondiciónelo como si fuera la primera vez que lo use.

4.3.1.9 Para evitar dañar el electrodo, no lo sumerja en soluciones que contengan solventes orgánicos como éter, hexano, tetracloruro de carbono, etc. Si es indispensable hacer una lectura en este tipo de soluciones, hágalo lo más rápidamente posible y después enjuáguelo perfectamente con agua desionizada. Inmediatamente después de enjuagar el electrodo colóquelo en una solución buffer de pH 7.0 durante dos horas antes de volverlo a emplear.

4.3.1.10 No emplee los electrodos en suspensiones o mezclas que contengan sólidos como arena o cristales de alta dureza ya que esto daña las membranas del electrodo haciéndolo inservible. En los electrodos rellenables es importante que la solución de llenado esté hasta la marca indicada en el electrodo.

4.3.1.11 Durante la lectura, destape el orificio de llenado para que la solución fluya a través del ensamble de referencia y que la lectura sea correcta. Una vez terminadas las lecturas tape el orificio con su sello específico (normalmente es un sello de goma). Dicho sello no debe fijarse al electrodo. Debido a que los electrodos registran diferencias de potencial eléctrico, cualquier variación en las condiciones de suministro de corriente alteran las lecturas. Uno de los errores más frecuentes proviene de un mal manejo de las conexiones entre el electrodo y el potenciómetro. NO enrolle el cable del electrodo sobre el cuerpo del mismo, lo correcto es formar un lazo y emplear un sujetador.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del pHmetro.	PNO: FCE.I.04.026
	Hoja No: 090 de 126
	Edición: 2

6 Configuración del sistema

- 6.1 Seleccione CONFIGURAR SISTEMA en el menú inicial, ayudándose de las teclas ▲ y ▼ y oprima la tecla
- 6.2.1 Para cambiar el IDIOMA, con ayuda de ▲ y ▼ seleccione de la lista el idioma deseado, luego presione.
- 6.2.2 Para cambiar la SALIDA DE DATOS, con ayuda de ▲ y ▼, seleccione de la lista la opción deseada y presione
- 6.2.3 De la misma manera cambie las demás opciones.
- 6.2.4 Una vez concluidos los cambios en CONFIGURAR SISTEMA oprima la tecla
- 6.3 El mismo procedimiento se utiliza para DATA LOGGER (REGISTRADOR DE DATOS).

7 Calibración.

- 7.1 Del menú inicial utilice ▲ y ▼ para seleccionar CALIBRACIÓN pH, luego presione a iniciar calibración.
- 7.2 Presione de nuevo para comenzar a medir el primer buffer de pH 4.01.
- 7.3 Vierta la solución buffer o de calibración en el vaso de calibración etiquetados correspondiente, que trae el equipo, con el agitador magnético.
- 7.4 Asegúrese que el electrodo se encuentre en óptimas condiciones, prepárelo para la medición, según 4.3.
- 7.5 Coloque el electrodo dentro del primer buffer (4.01), asegúrese que el diafragma y la membrana del electrodo queden sumergidos correctamente.
- 7.6 Presione y espere el pito del equipo que le indicará la lectura de pH.
- 7.7 Si la lectura del buffer es correcta el equipo le va a pedir que inserte el segundo buffer y luego el tercero.
- 7.8 Realice el procedimiento desde 7.3 hasta 7.7 para el segundo y tercer buffer (pH 7 y pH 10, respectivamente)
- Nota:** Recuerde siempre que cuando termine con un buffer, lave el electrodo con agua destilada.
- 7.9 Una vez terminada la calibración con los tres buffer técnicos, el equipo pedirá la opción de medir el pH de la muestra.

8 Medición de pH

- 8.1 Del menú inicial utilice ▲ y ▼ para seleccionar MEDICIÓN pH, luego presione a iniciar medición pH.
- 8.2 Vierta la muestra a medir en un recipiente (beaker) con un agitador magnético.
- 8.3 Asegúrese que el electrodo se encuentre listo, como se menciona en el acápite 4.3.
- 8.4 Introduzca el electrodo en la muestra, la membrana y el diafragma deben estar sumergidos correctamente, presione y espere el pito del equipo que le indicará la medida del pH.
- 8.5 Si ya se encuentra en la opción de medir el pH luego de haber calibrado el equipo, presione y siga los pasos descritos en 8.2, 8.3 y 8.4
- 8.6 Una vez terminada la medición, el equipo pedirá la opción de medir el pH a las demás muestras y así sucesivamente.
- Nota:** Recuerde siempre que termine de leer una muestra, lave el electrodo con agua destilada.
- 8.7 Para regresar al menú principal o inicial presione las veces necesarias.

9 Condiciones de seguridad para el cuidado del equipo

- 9.1 Asegúrese que el instrumento se encuentre siempre en buen estado de limpieza.
- 9.2 No desmonte el equipo para su mantenimiento o reparación, contacte al personal autorizado.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera
Firma:	Fecha:	Firma:
		Fecha:



INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del pHmetro.	PNO: FCE.I.04.026
	Hoja No: 091 de 126
	Edición: 2

9.3 Nunca utilice productos de limpieza como aguarrás, acetona o productos similares para limpiar el instrumento, incluidos la pantalla y los accesorios.

9.4 Utilice los agentes limpiadores indicados para limpiar las sondas de pH (electrodos) que aparecen en el manual en la página 77.

9.5 Cuando haya finalizado el trabajo, apague el equipo y luego desconéctelo de la corriente.

9.6 Deje los electrodos limpios como se plantea en 4.3.

10 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

11 Observaciones

11.1 Datos del equipo:

- Marca: sensION™ +pH 31.
- Modelo: HACH LANGE.
- Serie: 323184.
- País: España/China.

11.2 Características técnicas y metrológicas:

- Requisitos de alimentación (externa): 100 a 240 v; 0,4 A; 47 a 63 Hz
- Clase de protección del medidor: Clase II
- Consumo: 12 V.
- Frecuencia: 50/60 Hz.
- Potencia: 3.3 W.
- Rango de temperatura: 0 °C a 40 °C.
- Error de medición: ± 1 dígito
- Rango de pH: 0 a 14
- Dimensiones :35x20x11 cm(13.78x7.87x4.33 pulg)
- Peso:1100g (2.43)
- Reproducibilidad: (±1 dígito)
- Resolución: PH: 0.1/0.01/0.001,ORP:0.1/1mV, temperatura:0.1°C(0.18°F)
- Almacena

11.3 El mantenimiento técnico al equipo se contrata por el Centro y se realiza según el Plan de Mantenimiento. Se registra en las Tarjetas AT-5.

11.4 El equipo siempre se deja limpio cuando se termina de trabajar. Siempre que se use el equipo debe dejarse constancia en el Registro de Uso y limpieza del pHmetro (Anexo 1, código FCE.I.04.026/1).

11.5 La verificación se contrata por el Centro y se realiza según el Plan de Verificación/Calibración. Se archivan los Certificados.

12 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Uso y Limpieza del pHmetro, código FCE.I.04.026/1, Anexo 1

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del pHmetro.	PNO: FCE.I.04.026
	Hoja No: 092 de 126
	Edición: 2

13 Documento de referencia

Para otras funciones específicas con el equipo, consulte el Manual del Equipo desde la página 66 hasta la 81.

Anexo 1

Registro de Uso y limpieza del pHmetro

CBQ INVESTIGACIONES	Registro de uso y limpieza del pHmetro				Código: FCE.I.04.026/1	
					Área: UMEB	
					Página:	
Fecha	Producto / Trabajo	Buffer 4.01	Buffer 7.00	Buffer 10.00	Nombre	Observaciones

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:

Anexo #13



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo del phmetro.

Código: IT.FCE.I.04.026

Procedimiento

8.1 Del menú inicial utilice ▲ y ▼ para seleccionar MEDICIÓN pH, luego presione ✓ para iniciar medición pH.

8.2 Vierta la muestra a medir en un recipiente (beaker) con un agitador magnético.

8.3 Asegúrese que el electrodo se encuentre listo, como se menciona en el acápite 4.3.

8.4 Introduzca el electrodo en la muestra, la membrana y el diafragma deben estar sumergidos correctamente, presione ✓ y espere el pito del equipo que le indicará la medida del pH.

8.5 Si ya se encuentra en la opción de medir el pH luego de haber calibrado el equipo, presione ✓ y siga los pasos descritos en 8.2, 8.3 y 8.4

8.6 Una vez terminada la medición, el equipo pedirá la opción de medir el pH a las demás muestras y así sucesivamente.

Nota: Recuerde siempre que termine de leer una muestra, lave el electrodo con agua destilada.

8.7 Para regresar al menú principal o inicial presione ↶ las veces necesarias.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:

Anexo #14



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y cuidado del baño de agua termostatzado.	PNO: FCE.I.04.011
	Hoja No: 094 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento del baño de agua termostatzado y los cuidados para la conservación del equipo.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para el uso del Baño de agua termostatzado ubicado en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe de Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

El Técnico es el responsable de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

4.1 No encienda el aparato si no tiene agua.

4.2 No debe usarse el baño termostático de forma constante sin una supervisión.

4.3 Compruebe periódicamente el nivel del baño. La bomba y la resistencia deberán estar siempre cubiertas por el fluido.

4.4 No vacíe el baño si el medio líquido aun está caliente.

4.5 No se deberá poner en funcionamiento si está deteriorado o no hermético.

5 Procedimiento.

5.1 Conecte el equipo a la línea de 220 V.

5.2 Presionar el interruptor de encendido en la posición "I".

5.3 Pulse la tecla OK durante aproximadamente 4 segundos para el arranque manual. Durante la fase de calentamiento se iluminará el piloto de control amarillo, este comienza a parpadear a temperatura de trabajo en el interior del baño

5.4 Presionar brevemente una de las teclas de editado $\uparrow\downarrow$ para conmutar la visualización de valor real a valor de consigna. El valor de consigna se visualizara durante aproximadamente 8 segundos. Si se desea volver a visualizar el valor, deberá iniciarse la regulación dentro de este tiempo.

5.5 Para modificar valor con los botones $\uparrow\downarrow$ (para subir y bajar) entre el valor de temperatura seleccionada entre 25 y 100°C. Memorizar el valor de consigna con la tecla OK.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-11-14	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y cuidado del baño de agua termostatzado.	PNO: FCE.I.04.011
	Hoja No: 095 de 0126
	Edición: 1

5.6 Al concluir de trabajar, pulse la tecla OK durante aprox. 4 segundos.

5.7 Presionar el interruptor de encendido en la posición "O".

5.8 Desconecte el equipo a la línea de 220 V.

5.9 Arranque automático/manual (AUTOSTART).

5.9.1 Mantener pulsada la tecla "OK" y a la vez se presiona el interruptor de encendido en la posición "I".

5.9.2 En la pantalla del visor, por unos instantes, se visualiza el modo actual de arranque: Aon → arranque automático (AUTOSTART) activado; AOf → arranque automático (AUTOSTART) no activado.

5.10 Se deberá repetir los pasos a partir del 5.4

6 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

7 Observaciones

7.1 Datos del equipo:

- Marca: Julabo.
- Modelo: ED THERM 60.
- Serie: 12876
- País: Alemania.

7.2 Características técnicas y metrológicas:

- Voltaje: 230 V.
- Corriente: 9A
- Frecuencia: 50/60 Hz.
- Temperatura de trabajo: (20 a 100)^oC

7.3 Limpieza del equipo.

7.3.1 Pase por toda la superficie un paño húmedo La limpieza la realiza el personal técnico se deberá dejar evidencia en el Registro de Uso y Limpieza del Equipo FCE.I.04.011/1.

7.4 Mantenimiento técnico

El mantenimiento técnico al equipo está contratado por el Centro, deberá realizarse de acuerdo al Plan de Mantenimiento. Se deberá registrar en las tarjetas AT-5.

7.5 Verificación al equipo

La verificación al equipo está contratado por el Centro, se deberá realizar de acuerdo al Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2. Se deberán archivar los certificados de verificación y, calibración o reportes de medición correspondientes.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-11-14	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y cuidado del baño de agua termostatzado.	PNO: FCE.I.04.011
	Hoja No: 096 de 0126
	Edición: 1

8 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Uso y Limpieza del Baño de agua termostatzado, código FCE.I.04.011/1, Anexo 1.

9 Referencia / Documentos aplicables

El siguiente documento es indispensable para la aplicación de este PNO:

- Plan de Mantenimiento
- Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2

10 Bibliografía

- Manual del equipo.

Anexo 1

Registro de uso y limpieza del baño de agua termostatzado

CBQ INVESTIGACIONES		REGISTRO DE USO Y LIMPIEZA DEL BAÑO DE AGUA TERMOSTATIZADO		Código: FCE.I.04.011/1
				Área: UMEB
				Página:
Fecha	Hora I	Hora F	Nombre	Observaciones

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-11-14	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #15



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo de Equipo del Baño de agua termostaticado

Código: IT.FCE.I.04.011

Condiciones de seguridad

No encienda el aparato si no tiene agua.

No debe usarse el baño termostático de forma constante sin una supervisión.

Compruebe periódicamente el nivel del baño. La bomba y la resistencia deberán estar siempre cubiertas por el fluido.

No vacíe el baño si el medio líquido aun está caliente.

5 Procedimiento.

5.1 Conecte el equipo a la línea de 220 V.

5.2 Presionar el interruptor de encendido en la posición "I".

5.3 Pulse la tecla OK durante aproximadamente 4 segundos para el arranque manual. Durante la fase de calentamiento se iluminará el piloto de control amarillo, este comienza a parpadear a temperatura de trabajo en el interior del baño

5.4 Presionar brevemente una de las teclas de editado $\uparrow\downarrow$ para conmutar la visualización de valor real a valor de consigna. El valor de consigna se visualizara durante aproximadamente 8 segundos. Si se desea volver a visualizar el valor, deberá iniciarse la regulación dentro de este tiempo.

5.5 Para modificar valor con los botones $\uparrow\downarrow$ (para subir y bajar) entre el valor de temperatura seleccionada entre 25 y 100°C. Memorizar el valor de consigna con la tecla OK.

5.6 Al concluir de trabajar, pulse la tecla OK durante aprox. 4 segundos.

5.7 Presionar el interruptor de encendido en la posición "O".

5.8 Desconecte el equipo a la línea de 220 V.

5.9 Arranque automático/manual (AUTOSTART).

5.9.1 Mantener pulsada la tecla "OK" y a la vez se presiona el interruptor de encendido en la posición "I".

5.9.2 En la pantalla del visor, por unos instantes, se visualiza el modo actual de arranque: Aon → arranque automático (AUTOSTART) activado; AOf → arranque automático (AUTOSTART) no activado.

5.10 Se deberá repetir los pasos a partir del 5.4

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-11-14	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #16



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Disolutest.	PNO: FCE.I.04.002
	Hoja No: 098 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento del Disolutest y los cuidados para la conservación del equipo.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para el uso del Disolutest ubicado en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe de Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe de laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

El Técnico es el responsable de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

- Coloque el equipo sobre una superficie libre de vibraciones.
- Verifique que el equipo está totalmente nivelado horizontalmente.
- Llene el baño termorregulado con agua purificada hasta la marca establecida.
- Coloque el líquido alguicida (40 mL) en el baño termorregulado.

5 Procedimiento

5.1 Conecte el equipo a la corriente de 220V.

5.2 Ponga el interruptor en posición "I".

5.3 Ajuste de la velocidad de agitación y la temperatura.

NOTA; En la pantalla digital aparece la velocidad de agitación y la temperatura y al lado de ambos valores las teclas ON/OFF y ADJ.

5.3.1 Para cambiar la velocidad de agitación oprima la tecla ADJ y con el teclado numérico coloque el valor de velocidad deseado. Presione ON, de la velocidad de agitación, se comienzan a mover las paletas.

5.3.2 Para cambiar la temperatura oprima la tecla ADJ y con el teclado numérico coloque el valor de temperatura deseado. Presione ON, de la temperatura, parpadea un foquito rojo hasta alcanzar la temperatura programada.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-09-12	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Disolutesst.	PNO: FCE.I.04.002
	Hoja No: 099 de 0126
	Edición: 1

5.2.2 Llenado de los vasos con el medio de disolución.

- Encienda el baño termostático y espere que alcance la temperatura de ensayo (37±0.5) °C.
- Prepare el medio de disolución a ensayar en volumen suficiente para realizar el ensayo (aproximadamente 6 L, si se pretende usar 900 mL de medio en cada vaso).
- Desgasifique el medio antes de colocarlo en cada vaso de disolución.
- Coloque lentamente y con cuidado el medio de disolución en cada vaso, tratando de no incorporar aire.
- Espere que caliente el medio a 37°C (entre 20 y 25 minutos cerrados y unos 35 minutos abiertos).
- Al concluir el trabajo ponga en OFF la velocidad de agitación y la temperatura. Luego apague el equipo, colocando el interruptor en posición "0"

6 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior mediante auditorías realizadas y auto inspección.

7 Observaciones

7.1 Datos del equipo

- Marca: FHARMA-TEST.
- Modelo: DT.70
- Nacionalidad: Alemana.
- N° de serie: 18264

7.2 Características técnicas

- Voltaje: 230 V.
- Frecuencia: 50/60 Hz.
- Consumo: 828 W.
- Temperatura: 10°C a 40°C

7.3 Limpieza del equipo

7.3.1 Limpie las paletas con un frasco lavador.

7.3.2 Friegue bien los vasos.

7.3.3 Pase por toda la superficie un paño húmedo.

7.3.4 Llene el Registro de Uso y Limpieza del Equipo FCE.I.04.002/1

7.4 Mantenimiento técnico.

El mantenimiento técnico al equipo está contratado por el Centro, se deberá realizar de acuerdo al Plan de Mantenimiento. Se deberá registrar en las tarjetas AT-5.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-09-12	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Disolutest.	PNO: FCE.I.04.002
	Hoja No: 0100 de 0126
	Edición: 1

7.5 Verificación del equipo

La verificación técnica al equipo está contratado por el Centro, se deberá realizar de acuerdo al Plan de Verificación M.02.007/2. Se deberá archivar los certificados de verificación o reporte de medición.

8 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Uso y Limpieza del Agitador Vortex, código FCE.I.04.002/1, Anexo 1.

9 Referencia/ documentos aplicables

El siguiente documento es indispensable para la aplicación de este PNO:

- Plan de Mantenimiento.
- Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2

10 Bibliografía

Manual del equipo.

Anexo 1

Registro de uso y limpieza del Disolutest

CBQ INVESTIGACIONES		REGISTRO DE USO Y LIMPIEZA DEL DISOLUTEST		Código: FCE.I.04.002/1
				Área: UMEB
				Página:
Fecha	Hora I	Hora F	Nombre	Observaciones

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-09-12	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #17



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUIMICOS

Título: Instrucción de Trabajo de Equipo del Disolutest

Código: IT.FCE.I.04.002

Procedimiento

Conecte el equipo a la corriente de 220V.

Ponga el interruptor en posición "I".

Ajuste de la velocidad de agitación y la temperatura.

NOTA; En la pantalla digital aparece la velocidad de agitación y la temperatura y al lado de ambos valores las teclas ON/OFF y ADJ.

Para cambiar la velocidad de agitación oprima la tecla ADJ y con el teclado numérico coloque el valor de velocidad deseado. Presione ON, de la velocidad de agitación, se comienzan a mover las paletas.

Para cambiar la temperatura oprima la tecla ADJ y con el teclado numérico coloque el valor de temperatura deseado. Presione ON, de la temperatura, parpadea un foquito rojo hasta alcanzar la temperatura programada.

Llenado de los vasos con el medio de disolución.

- Encienda el baño termostático y espere que alcance la temperatura de ensayo (37±0.5) °C.
- Prepare el medio de disolución a ensayar en volumen suficiente para realizar el ensayo (aproximadamente 6 L, si se pretende usar 900 mL de medio en cada vaso).
- Desgasifique el medio antes de colocarlo en cada vaso de disolución.
- Coloque lentamente y con cuidado el medio de disolución en cada vaso, tratando de no incorporar aire.
- Espere que caliente el medio a 37°C (entre 20 y 25 minutos cerrados y unos 35 minutos abiertos).
- Al concluir el trabajo ponga en OFF la velocidad de agitación y la temperatura. Luego apague el equipo, colocando el interruptor en posición "0"

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-09-12	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #18



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Centrífuga	PNO: FCE.I.04.016
	Hoja No: 0102 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento de la Centrífuga y los cuidados para la conservación del equipo.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para el uso de la centrífuga ubicado en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe de Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

El Técnico es el responsable de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

Procure que el aparato no sufra golpes ni impactos.

5 Procedimiento.**5.1 Puesta en marcha**

5.1.1 Conecte la centrífuga con el interruptor de alimentación o con tecla Standby "I".

NOTA: Después de la conexión con el interruptor de alimentación, la tapa se abre automáticamente.

5.1.2 Abra la tapa de la centrífuga pulsando la tecla **open**

NOTA: A continuación aparecen los ajustes de parámetros del último funcionamiento.

5.2 Insertar otro rotor (si es necesario)

5.2.1 Coloque el rotor verticalmente sobre el eje del motor.

5.2.2 Inserte la llave de rotor suministrada en la tuerca del rotor

NOTA: Utilice únicamente el utensilio auxiliar adjunto para colocar o retirar el rotor.

5.2.3 Gire la llave de rotor en sentido horario hasta que la tuerca del rotor este totalmente apretada

5.3 Cargar el rotor

NOTA: Compruebe la carga máxima (adaptador, tubo y contenido) permisible para cada orificio de rotor y cargue los rotores y los adaptadores solo con los tubos previstos para ello.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Diaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-11-22	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Centrífuga	PNO: FCE.I.04.016
	Hoja No: 0103 de 0126
	Edición: 1

5.3.1 Introduzca los tubos por parejas en posición opuesta en los orificios del rotor.

NOTA: Para una carga simétrica, los tubos en posición opuesta tienen que ser del mismo tipo y contener la misma cantidad de sustancia.

5.3.2 Coloque y fije la tapa del rotor.

5.3.3 Presione la tapa de la centrífuga hacia abajo hasta que el bloqueo de tapa enganche y la tapa se cierre automáticamente (La tecla open se ilumina de color azul)

5.4 Centrifugación con ajuste de tiempo

5.4.1 Ajuste el tiempo de funcionamiento con la tecla “time”

5.4.2 Ajuste el valor g (FCR)/número de revoluciones con la flecha” speed”.

5.4.3 Pulse “start/stop” para iniciar la centrifugación.

NOTA: Durante la marcha usted puede modificar el tiempo de funcionamiento total y el número de revoluciones. Los nuevos parámetros son adoptados de inmediato.

5.5 Fin de la centrifugación.

5.5.1 Transcurrido el tiempo ajustado, la centrífuga se detiene automáticamente

5.5.2 Cuando el rotor se haya detenido por completo, se escucha una señal acústica y la tapa de la centrífuga se abre automáticamente.

5.5.3 Extraiga las sustancias de centrifugación

NOTA: Usted puede finalizar la centrifugación antes del tiempo de funcionamiento ajustado pulsando la tecla “start/stop”.

6 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías realizadas o auto inspección.

7 Observaciones

7.1 Datos del equipo

Marca: Eppendorf AG

Modelo: 5430

Serie: 5427YN510508

7.2 Características técnicas y metrológicas.

Voltaje: 230 V

Frecuencia: 50/60 Hz

Consumo: 460W

Max; 17500min

Max: 1.2Kg/dm³

País; Alemania

Rango de Medición (rpm): De 0 a 17500

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Diaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-11-22	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Centrífuga	PNO: FCE.I.04.016
	Hoja No: 0104 de 0126
	Edición: 1

7.3 Limpieza del equipo.

7.3.1 Pase por toda la superficie un paño húmedo cuando sea usada. La limpieza que le realiza al equipo el personal técnico dejará evidencia en el Registro de Uso y Limpieza del Equipo FCE.I.04.016/1.

7.4 Mantenimiento técnico

El mantenimiento técnico al equipo está contratado por el Centro, deberá realizarse de acuerdo al Plan de Mantenimiento. Se deberá registrar en las tarjetas AT-5.

7.5 Verificación al equipo

La verificación al equipo está contratado por el Centro, se deberá realizar de acuerdo al Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2. Se deberán archivar los certificados de verificación y/o calibración.

8 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Uso y Limpieza de la centrífuga, código FCE.I.04.016/1, Anexo 1.

9 Referencia/ documentos aplicables

El siguiente documento es indispensable para la aplicación de este PNO:

- Plan de Mantenimiento.
- Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2

10 Bibliografía

Manual del equipo.

Anexo 1

Registro de uso y limpieza de la centrífuga

CBQ INVESTIGACIONES		REGISTRO DE USO Y LIMPIEZA DE LA CENTRÍFUGA		Código: FCE.I.04.016/1
				Área: UMEB
				Página:
Fecha	Hora I	Hora F	Nombre	Observaciones

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Diaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-11-22	Firma: Fecha:

Anexo #19



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo de Equipo de la Centrifuga

Código: IT.FCE.I.04.016

5 Procedimiento.

5.1 Puesta en marcha

5.1.1 Conecte la centrifuga con el interruptor de alimentación o con tecla Standby “I”.

NOTA: Después de la conexión con el interruptor de alimentación, la tapa se abre automáticamente.

5.1.2 Abra la tapa de la centrífuga pulsando la tecla **open**

NOTA: A continuación aparecen los ajustes de parámetros del último funcionamiento.

5.2 Insertar otro rotor (si es necesario)

5.2.1 Coloque el rotor verticalmente sobre el eje del motor.

5.2.2 Inserte la llave de rotor suministrada en la tuerca del rotor

NOTA: Utilice únicamente el utensilio auxiliar adjunto para colocar o retirar el rotor.

5.2.3 Gire la llave de rotor en sentido horario hasta que la tuerca del rotor este totalmente apretada

5.3 Cargar el rotor

NOTA: Compruebe la carga máxima (adaptador, tubo y contenido) permisible para cada orificio de rotor y cargue los rotores y los adaptadores solo con los tubos previstos para ello.

5.3.1 Introduzca los tubos por parejas en posición opuesta en los orificios del rotor.

NOTA: Para una carga simétrica, los tubos en posición opuesta tienen que ser del mismo tipo y contener la misma cantidad de sustancia.

5.3.2 Coloque y fije la tapa del rotor.

5.3.3 Presione la tapa de la centrífuga hacia abajo hasta que el bloqueo de tapa enganche y la tapa se cierre automáticamente (La tecla open se ilumina de color azul)

5.4 Centrifugación con ajuste de tiempo

5.4.1 Ajuste el tiempo de funcionamiento con la tecla “**time**”

5.4.2 Ajuste el valor g (FCR)/número de revoluciones con la flecha” **speed**”.

5.4.3 Pulse “**start/stop**” para iniciar la centrifugación.

NOTA: Durante la marcha usted puede modificar el tiempo de funcionamiento total y el número de revoluciones. Los nuevos parámetros son adoptados de inmediato.

5.5 Fin de la centrifugación.

5.5.1 Transcurrido el tiempo ajustado, la centrifuga se detiene automáticamente

5.5.2 Cuando el rotor se haya detenido por completo, se escucha una señal acústica y la tapa de la centrifuga se abre automáticamente.

5.5.3 Extraiga las sustancias de centrifugación

NOTA: Usted puede finalizar la centrifugación antes del tiempo de funcionamiento ajustado pulsando la tecla “start/stop”.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Diaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma: Fecha: 13-11-22	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #20



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.	PNO: FCE.I.04.010
	Hoja No: 0106 de 126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento y cuidado del espectrofotómetro ultravioleta visible.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para la puesta en funcionamiento y cuidado del espectrofotómetro ultravioleta visible ubicado en el Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente. El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO. Los Técnicos del laboratorio en cuestión y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad para el cuidado del equipo

- 4.1 No llene completamente las cubetas para evitar el derramamiento del líquido en el interior del equipo.
- 4.2 Preste especial cuidado al trabajar con las cubetas, son frágiles y caras.
- 4.3 Si la corriente se interrumpe, apague y desconecte el equipo inmediatamente, para evitar que se afecte por cambios de voltaje.

5 Operaciones preliminares

- 5.1 Retire el protector plástico.
- 5.2 Realice una inspección visual y cerciórese que el equipo está limpio, al igual que las cubetas.
- 5.3 Conecte a la fuente de 220 V.
- 5.4 Para su encendido, oprima el interruptor de color negro que se halla en la parte posterior izquierda del equipo.
- 5.5 Utilice un frasco para los residuales de las lecturas.
- 5.6 Utilice papel de filtro o un paño suave para secar perfectamente las cubetas y que no se falseen las lecturas.
- 5.7 Una vez encendido el equipo, espere a que el equipo se autocalibre.

6 Medición de absorbancia**6.1 Obtención del espectro (barrido)**

- 6.1.1 El equipo está diseñado para que comience en este punto.
- 6.1.2 Llene las cubetas con las muestras y el blanco, séquelas bien por la parte transparente con un papel de filtro y colóquelas en el portaceldas, en las celdas correspondientes (el blanco en la B y la otra en la celda 1).
- 6.1.3 Con la ayuda de las teclas ▲ y ▼ seleccione los parámetros de trabajo que desee cambiar y presione ENTER.
- 6.1.3.1 Para poner un nombre a los archivos seleccione NOMBRE ANALISIS y presione AGREGAR CARACTER o CLEAR según sea el caso, finalmente seleccione ACEPTAR NOMBRE.

Seleccione CORRECCION DE CELDAS y presione ENTER para desactivar la opción (apagar).

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.	PNO: FCE.I.04.010
	Hoja No: 0107 de 126
	Edición: 1

6.1.3.2 Para salvar los espectros automáticamente vaya a AUTO ALMACENAMIENTO y presione ENTER para activarla (encendido), luego presione ENTER. Para que esta opción sea válida debe tener un dispositivo USB conectado al equipo. Si presiona PRINT el espectro también se guardará en formato excel en la USB conectada al equipo.

6.1.4 Con la ayuda del teclado y siguiendo las instrucciones del equipo haga los cambios correspondientes en cada uno de los parámetros, si desea darle atrás presione ESC y CLEAR si lo que necesita es borrar algún carácter, luego presione ENTER.

6.1.5 Terminados los cambios presione CORRER ANÁLISIS y espere que el equipo calibre, verifique el carrusel y ponga en la pantalla el gráfico de trabajo.

6.1.6 Automáticamente en la parte superior derecha debe indicar que el portaceldas está en el Blanco, luego presione MEDIR LIN. BASE para establecer la línea base con el blanco y espere el pito que indica que ha terminado.

6.1.7 Establecida la línea base, en la parte superior derecha aparece Celda n^o 1, entonces presione MEDIR MUESTRA para leer la absorbancia de la muestra en cuestión.

6.1.8 Si desea ver el espectro presione GRÁFICO, si lo que quiere son los valores de absorbancia entonces presione TABULAR.

6.1.9 Para modificar los ejes de coordenadas del grafico presione EDITAR GRAFICO y luego EDITAR ESCALA y siga las indicaciones del equipo.

6.1.9.1 Para modificar los ejes de la ordenada y la abscisa presione MANUAL y siga las indicaciones del equipo, para regresar utilice ESC.

6.1.9.2 Para mover el cursor por el gráfico y ver la absorbancia en cada punto presione CURSOR y siga las indicaciones del equipo, para regresar presione ESC.

6.2 Modo de Absorbancia. Lectura de muestras:

6.2.1 El equipo está diseñado para comenzar en la opción de barrido, a partir de aquí presione 2 veces ESC.

6.2.2 Llene las cubetas con las muestras y el blanco, séquelas bien por la parte transparente con un papel de filtro y colóquelas en el portaceldas, en las celdas correspondientes (el blanco en la B y las otras en las demás celdas, en el orden que prefiera).

6.2.3 Presione CAMBIAR MODO para seleccionar el modo de trabajo que prefiera, en este caso el modo Absorbancia.

6.2.4 Presione AJUSTAR MN para establecer la longitud de onda de trabajo, siga las instrucciones del equipo y utilice el teclado para introducir la longitud de onda y luego ENTER.

6.2.5 Presione MEDIR BLANCO para llevar la absorbancia a cero y espere a verificarlo en la pantalla del equipo.

6.2.6 Seleccione en la parte inferior derecha, en las teclas que indican la posición de la muestra, la tecla correspondiente y en la pantalla aparecerá el valor de la absorbancia deseado.

6.2.7 Presione TEST para seleccionar otros tipos de análisis si lo desea.

7 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías internas.

8 Observaciones

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación, Funcionamiento y Cuidado del Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.	PNO: FCE.I.04.010
	Hoja No: 0108 de 126
	Edición: 1

8.1 Datos del equipo:

- Marca: Thermo SCINTIFIC.
- Modelo: G10S UV-VIS Spectrophotometer.
- Serie: 2L9Q318115.
- País: China.

8.2 Características técnicas:

- Voltaje: 250 V.
- Frecuencia: 50/60 Hz.
- Consumo: 100-240 VAC

Nota: Para otras funciones específicas con el equipo, consulte el Manual del Equipo.

8.3 Limpieza del equipo

8.3.1 El equipo siempre se deja limpio cuando se termina de trabajar. La limpieza que le realiza al equipo el personal técnico y/o el personal autorizado se registra en el Registro de Uso del Espectrofotómetro. Esta consiste en limpiar el interior de la cavidad donde está ubicado el porta cubetas con una paño fino y que no deje pelusas, exteriormente también se le pasa un paño húmedo. Se realiza una vez al mes.

8.4 Mantenimiento técnico

8.4.1 El mantenimiento técnico al equipo se contrata por el Centro y se realiza según el Plan de Mantenimiento. Se registra en las Tarjetas AT-5.

8.5 Verificación del equipo

8.5.1 La verificación se contrata por el Centro y se realiza según el Plan de Verificación, una vez al año. Se archivan los Certificados.

8.5.2 La prueba de funcionamiento del equipo se hará cuando sea necesario por algún mantenimiento, reparación o cualquier otro aspecto que se considere influyente. Se deja constancia de la actividad realizada en el Registro de Prueba de Funcionamiento del Espectrofotómetro, código FCE.I.04.010/2, anexo 3, estos registros se archivarán.

8.6 Las cubetas de absorción, para su limpieza se sumergen en agua o en una disolución con detergente. Si el residuo, ya sea contaminación con otra disolución o suciedad, persiste, se prepara una mezcla de ácido clorhídrico ($d = 1,19 \text{ g/cm}^3$), agua y metanol en proporción 1:3:4 y se introducen las cubetas en esta disolución durante tres horas. Finalmente se enjuagan con agua potable y varias veces con agua destilada hasta que miradas a tras luz se vean totalmente transparentes. Cuando se realiza este tipo de limpieza más exhaustiva se deja constancia en el Registro de Uso del Equipo (anexo 1, código FCE.I.04.010/1).

8.7 Antes de utilizar las cubetas se someten a pruebas para eliminar errores producidos por la falta de limpieza, por diferencias en el espesor de las paredes o alteraciones en las propiedades ópticas de las mismas. Se les determinará:

8.7.1 La absorbancia con referencia de aire: se llena la cubeta con agua destilada y se mide la absorbancia de este sistema contra aire a una longitud de onda de 240 nm para cubetas de cuarzo y a 650 nm para las de vidrio. El valor de la absorbancia medido no será mayor de 0,093 unidades para las cubetas de cuarzo de 1 cm y de 0,035 para las de vidrio de igual paso de luz. Las cubetas, se rotan entonces en un ángulo de 180° dentro del portador de cubetas y se mide nuevamente la absorbancia. La diferencia en absorbancia entre las cubetas, antes y después de la rotación, no será mayor de 0,005 unidades, se deja constancia en el Registro de Prueba de las Cubetas, código FCE.I.04.010/3, anexo 4.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación, Funcionamiento y Cuidado del Espectrofotómetro Ultravioleta Visible.	PNO: FCE.I.04.010
	Hoja No: 0109 de 126
	Edición: 1

8.7.2 La aptitud para el uso analítico: se realizará la corrección de las cubetas mediante la determinación de la absorbancia en la cubeta para la disolución de ensayo y en la cubeta que contendrá la disolución de ensayo en blanco, llenas ambas con el solvente que se esté utilizando, a la longitud de onda de trabajo. Se considerará que las cubetas coinciden si la diferencia en absorbancia entre las mismas es menor que 0,01 unidades. El valor de la absorbancia encontrada en la cubeta para la disolución de ensayo será la corrección para dicha cubeta y se sustraerá del valor de las lecturas de absorbancia para disoluciones de ensayo con el mismo disolvente, cuando se use la misma cubeta para la disolución de ensayo y la misma cubeta para la disolución de ensayo en blanco. Las mediciones se repetirán cinco veces como mínimo y se tomará como resultado el promedio de las mismas, se deja constancia en el Registro de Prueba de las Cubetas, código FCE.I.04.010/3, anexo 4.

Nota: El punto 8.7.2 se hace siempre antes de realizar alguna técnica de cuantificación. Y si es necesario hacer alguna corrección se reportará en la Hoja de datos con que se trabaja. El punto 8.8.1 se realiza cuando exista alguna duda o se compre una cubeta nueva y se anexa a la Hoja de datos con que se trabaja.

9 Requisitos de documentación

Llene correctamente los siguientes registros del Espectrofotómetro Ultravioleta Visible: Registro de uso del espectrofotómetro, código FCE.I.04.010/1, Anexo 1; Registro de prueba de funcionamiento del espectrofotómetro, código FCE.I.04.010/2; Anexo 3; Registro de prueba de las cubetas, código FCE.I.04.010/3, Anexo 4.

Anexo 1 Registro de Uso del Espectrofotómetro

CBQ INVESTIGACIONES		Registro de uso del espectrofotómetro			Código: FCE.I.04.010/1	
					Área: UMEB	
					Página:	
Fecha	Producto / Trabajo	Hora I	Hora F	Nombre	Observaciones	

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García		Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón		Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera	
Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:	Firma:	Fecha:

Anexo #21



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo. Espectrofotómetro Ultravioleta – Visible (UV-VIS)

Código: IT.FCE.I.04.010

Procedimiento para el funcionamiento del equipo.

- Retire el protector plástico.
- Conecte a la fuente de 220 V.
- Para su encendido, oprima el interruptor de color negro que se halla en la parte posterior izquierda del equipo.
- Espere la señal que indica la autocalibración del equipo (un pito).
- Escoja el modo de trabajo que desee (Modo básico A-%T-C, Barrido, etc.).

Modo básico A-%T-C (Lectura de muestras).

- Para establecer el modo de trabajo A-%T-C presione **ESC** y luego oprima la flecha que indica **ATC básica** en la pantalla del equipo. Para seleccionar el modo de trabajo presione la flecha que indica **Cambiar modo**.
- Llene las cubetas con el blanco y las muestras. Séquelas bien por la parte transparente con un papel de filtro.
- Realice los pasos 1 y 2 referidos a la Prueba de las cubetas, descritos con anterioridad, según proceda.
- Coloque las muestras en el portaceldas, en las celdas correspondientes (el blanco en la B y las demás en el orden que prefiera).
- Para establecer la longitud de onda, oprima la flecha que indica **Ajustar nm**, en la pantalla del equipo e introduzca la longitud deseada luego presione **ENTER**.
- Una vez establecido el modo y ajustada la longitud de onda, oprima la flecha que indica **Medir Blanco**, en la pantalla del equipo y espere la lectura.
- Luego, para medir la muestra presione la tecla de la posición de la celda y espere el resultado.

Obtención del espectro (barrido).

- Si esta en el modo ATC presione la tecla que indica **TEST**.
- Vaya a la opción de **Barrido**, ayudándose del cursor, presione **ENTER**.
- Llene las cubetas, séquelas bien por la parte transparente con un papel de filtro y colóquelas en el portaceldas de manera correcta.
- Para seleccionar el intervalo de longitudes de onda (inicial y final), deslice el cursor hasta la opción correspondiente, presione **ENTER**, escriba la longitud de onda deseada y vuelva a presionar **ENTER**.
- Lleve el portaceldas a la posición del blanco. Oprima la flecha que indica **Correr Análisis**, en la pantalla del equipo.
- Oprima la flecha que indica **Medir Lin. Base**, en la pantalla del equipo y espere a que pite, señal de que terminó.
- Oprima la flecha que indica **Medir Muestra**, en la pantalla del equipo y espere a que pite dos veces, señal de que terminó.

Edición del espectro.

Presione la tecla **PRINT** para imprimir el espectro obtenido.

Al finalizar retire las cubetas del portaceldas, friéguelas y póngalas a secar, guarde las cubetas una vez que estén secas, en su estuche, para evitar ralladuras y roturas.

Apague el equipo, desconéctelo de la línea y colóquelo la cubierta plástica.

Elaborado por: MSc. Yaidel A. Quiñones García	Revisado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Aprobado por: DrC. Miguel Ángel Cabrera
Firma: Fecha:	Firma: Fecha:	Firma: Fecha:

Anexo #22



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de las Campana de Extracción.	PNO: FCE.I.04.005
	Hoja No: 0111 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento de la campana de extracción y los cuidados para su conservación.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para el uso de la campana de extracción ubicada en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe de Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe de laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

El Técnico es el responsable de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

La campana de extracción se emplea para trabajar con sustancias que afectan la salud humana, por tanto, haga buen uso de ella y cerciórese si tiene que emplear algún otro medio de protección.

5 Procedimiento

5.1 Accione el dispositivo de encender (botón verde).

5.2 Durante el trabajo mantenga la puerta de la campana abierta a una altura de 50 cm aproximadamente.

5.3 Mientras no esté trabajando frente a la campana, ya sea encendida o apagada, mantenga la puerta a una altura aproximada de 2,5 cm.

5.4 El botón blanco es para encender la luz interior, la llave de la derecha es para agua, la llave de la izquierda es para el gas; no está instalada.

5.5 Una vez finalizado el trabajo accione el dispositivo de apagar (botón rojo).

6 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías realizadas o auto inspección.

Elaborado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera
Firma:	Fecha: 13-02-17	Firma: Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado de las Campana de Extracción.	PNO: FCE.I.04.005
	Hoja No: 0112 de 0126
	Edición: 1

7 Observaciones

7.1 Datos del equipo:

- País: Cuba.

7.2 Características técnicas:

- Voltaje: 220 V.

7.3 Limpieza del equipo.

7.3.1 Pase por toda la superficie un paño húmedo La limpieza que le realiza al equipo el personal técnico deja evidencia en el Registro de Uso y Limpieza del Equipo FCE.I.04.005/1.

7.4 Mantenimiento técnico

El mantenimiento técnico al equipo está contratado por el Centro, deberá realizarse de acuerdo al Plan de Mantenimiento. Se deberá registrar en las tarjetas AT-5.

7.5 Verificación al equipo

La verificación al equipo está contratado por el Centro, se deberá realizar de acuerdo al Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2. Se deberán archivar los certificados de verificación y/o calibración.

8 Requisitos de documentación

Llene correctamente la Libreta de Uso y Limpieza de la Campana de Extracción, código FCE.I.04.005/1, Anexo 1.

9 Referencia/ documentos aplicables

El siguiente documento es indispensable para la aplicación de este PNO:

- Plan de Mantenimiento.

Anexo 1

Registro de Uso y limpieza de la Campana de Extracción

CBQ INVESTIGACIONES		REGISTRO DE USO Y LIMPIEZA DE LA CAMPANA DE EXTRACCIÓN			Código: FCE.I.04.005/1
					Área: UMEB
					Página:
Fecha	Hora I	Hora F	Nombre	Observaciones	

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera
Firma:	Fecha: 13-02-17	Firma: Fecha:

Anexo #23



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo. Campana de extracción.

Código: IT.FCE.I.04.005

5 Procedimiento

- Accione el dispositivo de encender (botón verde).
- Durante el trabajo mantenga la puerta de la campana abierta a una altura de 50 cm aproximadamente.
- Mientras no esté trabajando frente a la campana, ya sea encendida o apagada, mantenga la puerta a una altura aproximada de 2,5 cm.
- El botón blanco es para encender la luz interior, la llave de la derecha es para agua, la llave de la izquierda es para el gas; no está instalada.
- Una vez finalizado el trabajo accione el dispositivo de apagar (botón rojo).

Elaborado por: MSc. Tania M. Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera
Firma:	Fecha: 13-02-17	Firma:
	Fecha:	Firma:
		Fecha:

Anexo #24

CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Baño Ultrasónico.	PNO: FCE.I.04.006
	Hoja No: 0114 de 0126
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece los pasos a seguir para la puesta en funcionamiento del baño ultrasónico y los cuidados para la conservación del equipo.

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable para el uso del Baño Ultrasónico ubicado en la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB).

3 Responsabilidades

El Jefe de Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica (UMEB) es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

El Técnico es el responsable de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Condiciones de seguridad

- 4.1 No opere el equipo si el nivel del agua no está en la marca indicadora. Use preferiblemente agua destilada.
- 4.2 No coloque en el equipo ningún beaker u otro recipiente sin sujetarlo convenientemente con una pinza a un soporte.
- 4.3 No emplee sustancias combustibles, ácidos o agentes clorinados para la limpieza del tanque del equipo.

5 Procedimiento

- 5.1 Conecte el equipo a la línea de 220 V.
- 5.2 Ponga el interruptor en posición "I"
- 5.3 Accione el botón para marcar la temperatura deseada. Automáticamente se enciende un bombillo rojo
- 5.4 Accione el botón para marcar el tiempo deseado. Automáticamente se enciende un bombillo rojo
- 5.5 Ponga el botón negro en mínimo "I" o máximo "II", según desees.
- 5.6 Finalizado el tiempo, retire con cuidado el frasco, ponga el interruptor en posición "O".
- 5.7 Desconecte el equipo de la línea.

NOTA: Si va a estar muchos días sin emplear el equipo vétele el agua.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-09-20	Firma:
	Fecha:	Firma:
		Fecha:



Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Baño Ultrasónico.	PNO: FCE.I.04.006
	Hoja No: 0115 de 0126
	Edición: 1

6 Controles

A través de supervisiones realizadas por el Jefe inmediato superior a la documentación que se deriva de este PNO y mediante auditorías realizadas o auto inspección.

7 Observaciones

7.1 Datos del equipo:

- Marca: Raypa.
- Modelo: UCI-150.
- Serie: 68223.
- País: Alemania.

7.2 Características técnicas:

- Voltaje: 230 V.
- Frecuencia: 50/60 Hz.
- Temperatura: 90C
- Tiempo: 15 min.
- Consumo 400 W
- # inventario: 330551

7.3 Limpieza del equipo.

7.3.1 Pase por toda la superficie un paño húmedo. La limpieza que le realiza al equipo el personal técnico deja evidencia en el Registro de Uso y Limpieza del Equipo FCE.I.04.006/1.

7.4 Mantenimiento técnico

El mantenimiento técnico al equipo está contratado por el Centro, deberá realizarse de acuerdo al Plan de Mantenimiento. Se deberá registrar en las tarjetas AT-5.

7.5 Verificación al equipo

La verificación al equipo está contratado por el Centro, se deberá realizar de acuerdo al Plan de Verificación y/o Calibración M.02.007/2. Se deberán archivar los certificados de verificación y/o calibración.

8 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Uso y Limpieza del Baño Ultrasónico, código FCE.I.04.006/1, Anexo 1.

9 Referencia / Documentos aplicables

El siguiente documento es indispensable para la aplicación de este PNO:

- Plan de Mantenimiento

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-09-20	Firma:
	Fecha:	Firma:
		Fecha:



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Funcionamiento y Cuidado del Baño Ultrasonico.	PNO: FCE.I.04.006
	Hoja No: 0116 de 0126
	Edición: 1

10 Bibliografía

- Manual del equipo.

Anexo

Registro de uso y limpieza del Baño Ultrasonico

CBQ INVESTIGACIONES		REGISTRO DE USO Y LIMPIEZA DEL BANO ULTRASONICO		Código: FCE.I.04.006/1
				Área: UMEB
				Página:
Fecha	Nombre	Tiempo de uso	Observaciones	

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-09-20	Firma:
	Fecha:	Firma:
		Fecha:

Anexo #25



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Título: Instrucción de Trabajo de Equipo del Baño Ultrasónico.

Código: IT.FCE.I.04.006

Condiciones de seguridad

- No opere el equipo si el nivel del agua no está en la marca indicadora. Use preferiblemente agua destilada.
- No coloque en el equipo beaker u otros recipientes sin sujetarlos convenientemente con una pinza a un soporte.
- No emplee sustancias combustibles, ácidos o agentes clorinados para la limpieza del tanque del equipo.

Procedimiento

- Conecte el equipo a la línea de 220 V.
- Ponga el interruptor en posición “I”
- Accione el botón para marcar la temperatura deseada. Automáticamente se enciende un bombillo rojo
- Accione el botón para marcar el tiempo deseado. Automáticamente se enciende un bombillo rojo
- Ponga el botón negro en mínimo “I” o máximo “II”, según desees.
- Finalizado el tiempo, retire con cuidado el frasco, ponga el interruptor en posición “O”.
- Desconecte el equipo de la línea.

NOTA: Si va a estar muchos días sin emplear el equipo vétele el agua.

Elaborado por: MSc. Tania Betancourt Purón	Revisado por: MSc. Neyda Díaz Machado.	Aprobado por: Dr C. Miguel A. Cabrera Pérez.
Firma:	Fecha: 13-09-20	Firma:
	Fecha:	Firma:
		Fecha:

Anexo #26



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Control de datos para Estudios de Bioequivalencia.	PNO: I.12.003
	Hoja No:
	Edición: 1

1 Objetivo

Este procedimiento establece el método para el control de los datos obtenidos en los estudios de Bioequivalencia que se realizan en Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas (UMEB).

2 Alcance

Este procedimiento es aplicable solamente al documento en Microsoft Office Excel 2007, en el que se encuentran y procesan los datos obtenidos en los estudios de Bioequivalencia que se realizan en la UMEB.

3 Responsabilidades

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de implantar este PNO y de crear las condiciones necesarias para planificar, organizar, ejecutar y controlar el procedimiento, así como entrenar al personal. Responde ante la dirección del Centro de Bioactivos Químicos por lo expuesto anteriormente.

El Jefe del Laboratorio de la UMEB es el responsable de controlar el cumplimiento de los procedimientos establecidos en este PNO.

Los Técnicos del laboratorio de la UMEB y/o el personal autorizado previamente, serán los máximos responsables de ejecutar los procedimientos establecidos en este PNO.

4 Procedimiento

4.1 Cada técnico o personal autorizado, cada vez que desarrolle un ensayo, comenzando por la validación de la técnica, anotará todos los datos y resultados de sus análisis en los registros correspondientes, para luego llevarlo al documento en Excel.

4.2 En la computadora **UMEB-02** de la UMEB, se halla el documento en Microsoft Office Excel 2007 que se ha confeccionado para el procesamiento de los datos obtenidos. Pueden iniciar sesión en esta computadora el personal del Laboratorio de la UMEB y el administrador de la red del Centro.

4.3 En el documento de Excel, diseñado por personal del laboratorio, se pueden realizar los cálculos relacionados con:

- Validación de las técnicas.
- Ensayos de disolución.
- Ensayos de permeabilidad.
- Ensayos de solubilidad.

4.4 El documento Excel con el nombre de “*Cálculos para Estudios de Bioequivalencia*”, se localiza en “**work (D;)/Public/Bioequivalencia**” y solo la o las personas que realicen estos ensayos y el Jefe del Laboratorio de la UMEB tienen conocimiento de la clave o contraseña del documento protegido.

4.5 El personal autorizado para realizar los cálculos empleando el documento de Excel, para lo cual han sido previamente capacitados, una vez terminados estos, imprimen los resultados y los entregan junto con el registro de datos primarios al Jefe del Laboratorio de la Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéuticas.

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García	Revisado por: MSc. Amalia Calvo Alonso	Aprobado por: DrC. Miguel Angel Cabrera Pérez
Firma:	Fecha:	Firma:
		Fecha:



INVESTIGACIONES

Título: Procedimiento Normalizado de Operación. Control de datos para Estudios de Bioequivalencia.	PNO: I.12.003
	Hoja No:
	Edición: 1

4.6 EL documento Excel empleado para cada Ensayo de Bioequivalencia, queda guardado por seis (6) años en formato electrónico, una copia la tendrá el Jefe del Laboratorio de la UMEB y otra estará en el servidor del Centro y solo el Jefe del Laboratorio de la UMEB y el Administrador de la red, tendrán acceso a estas copias de seguridad.

4.7 El Jefe del Laboratorio de la UMEB dispondrá, de ser necesario, para que se guarde una copia dura (impresa) del documento.

4.8 Existen juegos de datos para la validación del documento Excel, estos se encuentran en poder del Jefe del Laboratorio de la UMEB. Este documento de Microsoft Office Excel 2007 se valida cada vez que se comience un estudio nuevo y queda constancia de la actividad realizada en el Registro I.12.003/1, Anexo 1. La validación la realiza la persona que vaya a realizar el estudio, con la supervisión del Jefe del Laboratorio o solamente este último de ser necesario.

5 Requisitos de documentación

Llene correctamente el Registro de Validación de Hojas de Cálculo I.12.003/1 (Anexo 1).

11 Bibliografía

- NC ISO-IEC 17025: 2006 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
- Regulación 37-2012 Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. CECMED.

Anexo 1. Registro de validación de hojas de cálculo

CBQ UNIDAD DE MODELACION Y EXPERIMENTACION BIOFARMACEUTICAS		REGISTRO DE CONTROL DE DATOS PARA ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA			Código: I.12.003/1
					Área: UMEB
					Páginas:
Fecha	Hoja de cálculo	Nombre y firma del que ejecuta	Conforme	No conforme	Observaciones

Supervisado por:

Fecha:

Firma:

Elaborado por: MSc. Yaidel Quiñones García	Revisado por: MSc. Amalia Calvo Alonso	Aprobado por: DrC. Miguel Angel Cabrera Pérez
Firma:	Fecha:	Firma:
		Fecha: