

REVISTA

CIENCIA Reguladora

INFORME DE GESTION:

Registro de Establecimientos y de Especialidades Medicinales durante el primer semestre de 2017



anmat

VIGILANCIA DE MERCADO

Control de Especialidades Medicinales que contienen Orlistat

ARTICULOS ORIGINALES

Desarrollo y validación de Metodología Analítica: *Fumonisin, Pesticidas, Benzodiazepinas.*

REVISION SISTEMATICA

Canabinoides y Epilepsia

OPTIMIZACION DE TECNOLOGIAS

Incorporación de HPLC Ultrarrapida



AUTORIDADES

Presidente de la Nación
Ing. Mauricio MACRI

Jefe de Gabinete de Ministros
Lic. Marcos PEÑA

Ministro de Salud
Prof. Dr. Jorge LEMUS

Secretario de Políticas, Regulación e Institutos
Dr. Raúl Alejandro L. RAMOS

**Administración Nacional de Medicamentos,
Alimentos y Tecnología Médica**
Dr. Carlos CHIALE - Administrador Nacional
Dr. Roberto LEDE - Sub Administrador Nacional

EQUIPO EDITORIAL

Dirección de Recursos Humanos y Organización
Sra. Nélide MORINIGO

Coordinación de Capacitación e Investigación Científica Sanitaria
Lic. Karina BALBUENA

Servicio de Investigación
Bioq. Leandro LEPERA
Farm. Betina DOCTOROVICH
Lic. Cecilia VÁZQUEZ

DISEÑO Y DIAGRAMACION

Dirección de Relaciones Institucionales y Regulación Publicitaria
Lic. Sebastián DUARTE
Lic. Rodrigo PIÑEIRO
D.G. Federico TORRADO

ÍNDICE

Trabajos Originales

Fumonisinias en alimentos a base de maíz:
Desarrollo y validación analítica de la metodología 06
Sonia Fuertes y Col.

Metodología Analítica para el Análisis de Multirresiduos
de Pesticidas en Harina de Trigo y Productos Derivados 10
Jonathan Pietronave y Col.

Desarrollo de una Metodología por Cromatografía Gaseosa
acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) para el Análisis
de Benzodiazepinas en Productos Farmacéuticos 14
Mariela Baldut y Col.

Revisión Sistemática

Cannabinoides y Epilepsia 19
Programa de Evaluación de Tecnologías Sanitarias

Estado de Situación

Informe de Gestión: Registro de Medicamentos
(Primer Semestre Año 2017) 24
Margarita Melgarejo - Roberto Sierras

Vigilancia de Mercado (Corte Horizontal)

Control del Mercado Argentino de Especialidades
Medicinales que contienen Orlistat 32
María Pilar Alvarez y Col.

Artículos de Gestión

Incorporación de Nuevas Tecnologías: Optimización del
Análisis de Muestras Mediante Incorporación de la Técnica
Cromatografía Líquida de Alta *Performance* Ultrarrápida 34
Marcela I. García, Nadia S. Villar, María C. De Angelis y Col.



EDITORIAL

Septiembre, 2017

En estos días nuestra institución vive un momento histórico, sus primeros veinticinco años de vida. Sin lugar a dudas, ello constituye un motivo de inmensa alegría y orgullo para todos aquellos que forman o formaron parte de la construcción y de la historia ANMAT. A lo largo de todos estos años la institución se ha constituido en un organismo de referencia nacional e internacional a través sus acciones esenciales en el cuidado de la salud de la comunidad, garantizando con ello el acceso a productos seguros, eficaces y de calidad. Esto representa un logro e indiscutiblemente pertenece a todos y cada uno de los que han dado su aporte para el crecimiento institucional.

En este marco, tenemos la gran satisfacción de presentar el primer número de la "Revista Ciencia Reguladora", la cual constituirá un canal de comunicación de aquellos trabajos científicos y de divulgación desarrollados por todas las áreas de nuestro organismo.

El concepto de Ciencia Reguladora es central para las agencias sanitarias y puede ser definido desde distintas perspectivas. Así, dentro del marco de la *Coalición Internacional para la Investigación en Ciencia Reguladora*¹, aquella se define como la "ciencia que se ocupa del desarrollo de métodos, herramientas, estándares y criterios para evaluar la seguridad, eficacia, calidad y la performance de los productos sanitarios"¹. Por otro lado, una definición más aplicada refiere a la Ciencia Regulatoria como la vía o el medio para "la toma de decisiones regulatorias basada en la mejor evidencia científica disponible". Ambas definiciones son válidas y se complementan, poniendo de relieve la importancia del uso del método científico para la generación de evidencia y su relevancia en la toma de decisiones.

El marco de la ciencia reguladora es amplio, se puede dar en diferentes ámbitos y a distintos niveles en una agencia sanitaria. Constituye la base para establecer métodos, criterios, enfoques y normas con que las agencias desarrollan sus tareas. Sin lugar a dudas, la repercusión de cada acción regulatoria presenta un correlato multidimensional, por lo que es necesaria una evaluación previa, de manera de prever el impacto sobre los diversos actores implicados, fundamentalmente sobre la salud de los ciudadanos (por este motivo, el principio de precaución es central).

¹La *Coalición Global para la Investigación en Ciencia Reguladora (GCRSR)*, por sus siglas en inglés) fue fundada en el año 2013 por varias de las principales agencias reguladoras internacionales, formando parte nuestra institución de su Comité Ejecutivo.

En este contexto y en el proceso de desarrollar una gestión que responda a estas necesidades, la recopilación de datos e información se vuelve esencial. Para ello se apela a un gran número de fuentes de información, teniendo el aporte multidisciplinario de reguladores, sociedad, académicos e industria regulada, entre otros.

De esta manera, el análisis de la información generada y recolectada, junto al conocimiento previo (formación-capacitación-entrenamiento) y la experiencia constituyen el insumo indispensable para la toma de decisiones.

Tal como fue descrito en publicaciones institucionales anterioresⁱⁱ, en Ciencia Reguladora los márgenes de incertidumbre pueden ser más amplios que en la ciencia académica debido a la escasez de datos o a las múltiples variables involucradas. Asimismo, se remarca que en muchas ocasiones el tiempo disponible para la toma de decisión puede ser cotado debido a la urgencia o celeridad de respuesta requerida. Por este motivo el concepto del manejo de riesgo es central y la aplicación de metodologías de análisis y gestión de riesgo resultan esenciales para maximizar la ecuación beneficio/riesgo ante cada decisión regulatoria.

Finalmente, es necesario mencionar la notable innovación tecnológica de los últimos años y la necesidad de acompañar, evaluar y fomentar el desarrollo de estas tecnologías dentro de un marco regulatorio adecuado. Este constituye un gran desafío para la institución, dado que dichas innovaciones podrán permitir una mejora real en la salud y la calidad de vida de las personas, en la medida en que aseguremos las ventajas y beneficios de tales tecnologías, minimizando al máximo sus riesgos. Este es el gran desafío que nos imponemos para los próximos años en ANMAT.

Dr. Carlos A. Chiale

ⁱHoward PC, Tong W, Weichold F, Healy M, Slikker W. *Global Summit on Regulatory Science 2013*. Regul Toxicol Pharmacol. 2014 Dec;70(3):728-32.

ⁱⁱCiencia Reguladora (Editorial). Revista Ciencia ANMAT. 2012 Sep;0(1).

FUMONISINAS EN ALIMENTOS A BASE DE MAÍZ: DESARROLLO Y VALIDACIÓN ANALÍTICA DE LA METODOLOGÍA

Fuertes, Sonia; Villafañe, Virginia; Maseda, Juan Pablo; D'Espósito, Lourdes; Ruarte, Silvana; Garbini, Adriana y De Nicola, Matías
Departamento Control y Desarrollo Dirección de Fiscalización, Vigilancia y Gestión de Riesgo
Instituto Nacional de Alimentos (INAL – ANMAT)
ldesposito@anmat.gov.ar

RESUMEN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por especies de hongos que contaminan los productos agrícolas. Dentro del género *Fusarium*, las fumonisinas B₁, B₂ y B₃ son las más relevantes, crecen en forma endógena en el maíz y presentan efectos tóxicos para la salud humana y animal. Como objetivo se planteó desarrollar y validar una metodología analítica para cuantificar fumonisinas en alimentos a base de maíz. La determinación de fumonisinas consistió en tres etapas: extracción con metanol:agua, purificación con columnas de extracción en fase sólida y, separación, detección y cuantificación en cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC/FL) previa derivatización de los analitos. Se estandarizaron las condiciones operativas de la metodología analítica, particularmente las condiciones de extracción y purificación de la muestra, la etapa de derivatización y las condiciones cromatográficas. Se validó la técnica cumpliendo con los criterios de aceptabilidad especificados para los parámetros de selectividad para FB₁, FB₂ y FB₃, linealidad (R² mayor a 0,97), sensibilidad (LOD y LOQ adecuados) y precisión (repetibilidad y reproducibilidad entre analistas). La recuperación obtenida fue de 104% para FB₁, 88% para FB₂ y 79% para FB₃. Por lo tanto, el método propuesto proporciona una herramienta eficaz y confiable para el estudio de la contaminación por fumonisinas en alimentos.

Palabras claves: fumonisinas, maíz, desarrollo, validación, cromatografía.

1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos naturalmente por varias especies de hongos que contaminan los productos agrícolas. Son objeto de interés mundial debido a las pérdidas económicas relacionadas con los efectos sobre la salud pública, la productividad de los animales y el comercio nacional e internacional. Según la FAO se estima que aproximadamente un 25% de los cultivos de cereales del mundo están contaminados por algún tipo de micotoxina. Dentro del género *Fusarium*, las fumonisinas B₁, B₂ y B₃ son las más importantes y crecen en forma endógena en el maíz. Se encuentran en la naturaleza en una relación 4:2:1, respectivamente. Presentan efectos tóxicos en animales (leucoencefalomacia en equinos, edema pulmonar en cerdos y cáncer de hígado en ratas) y se han relacionado con incidencia de cáncer de esófago y defectos del tubo neural en humanos, principalmente en aquellas poblaciones cuya dieta se basa en el maíz. La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, catalogó a las fumonisinas como posibles carcinógenos humanos (Grupo 2B).

Recientemente, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) puso de manifiesto que, en la mayoría de los países, hay una incidencia elevada (70%) de fumonisinas en maíz, con un nivel mundial medio del total de fumonisinas de alrededor de 1.700 µg/kg. Concluyeron que es muy deseable que se reduzca la exposición a éstas, sobre todo en las regiones del mundo donde el maíz es un alimento básico de la dieta. Teniendo en cuenta estas consideraciones, se hace indispensable disponer de métodos de análisis rápidos y confiables que permitan a los laboratorios nacionales de referencia aportar datos de contaminación por fumonisinas con el fin de controlar el riesgo para la salud pública.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y validar una metodología analítica para cuantificar fumonisinas en alimentos a base de maíz.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos y materiales

Se utilizaron estándares de FB₁, FB₂ y FB₃ de 50,0 µg/ml (Biopure®). Para la solución derivatizante se utilizó o-ftalaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol (2-ME) (Sigma®). Las columnas fueron de fase sólida e intercambio aniónico (SPE-SAX, UCT®). Se utilizó metanol, acetonitrilo y agua grado HPLC. La matriz consistió en un material de referencia de maíz sin presencia de fumonisinas (Trilogy®).

2.2. Curva de calibración

Se establecieron 5 niveles para las curvas de calibración de cada fumonisina, teniendo en cuenta los límites establecidos por la legislación internacional (Reglamento CE N° 1881/2006 de la Unión Europea) y la ocurrencia natural. Las curvas presentaron los siguientes rangos: FB₁ 100-750 µg/kg; FB₂ 50-375 µg/kg y FB₃ 30-250 µg/kg. Inicialmente se realizó la curva de calibración a partir de los patrones para estandarizar diferentes parámetros de la metodología. Luego, se realizó el proceso de validación con la curva de calibración sobre matriz debido a que contempla interacciones analito-matriz y fase móvil-matriz y presenta mayor similitud con respecto a muestras alimentarias.

2.3. Procedimiento de extracción

Se pesaron 25 g de muestra (fortificada con FB₁, FB₂ y FB₃ en los diferentes niveles de la curva) y se realizó la extracción con 50 ml de metanol:agua. Se procedió a la limpieza del extracto por medio de columnas

SPE-SAX. Las toxinas se eluyeron de la columna, se concentraron y se resuspendieron en acetonitrilo:agua. Se realizó una derivatización pre-columna online con OPA y 2-ME, separación y detección en el HPLC/FL.

2.4. Condiciones cromatográficas

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en HPLC Shimadzu®. El equipo está compuesto por módulo de bomba LC-20AD, inyector automático SIL-20AC, horno de columna CTO-20AC y detector de fluorescencia RF-20A. Para la separación se utilizó una columna C18 (VP-ODS 150 x 4,6 mm, 4,6 µm) y un guardacolumna (100 x 4,6 mm) de Shimadzu®. El tiempo de corrida fue de 25 minutos. Las longitudes de onda para el detector fueron 335 nm (excitación) y 440 nm (emisión).

2.5. Validación analítica

Se siguieron los lineamientos del Reglamento CE N° 401/2006 de la Unión Europea y la "Guía Eurachem para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016)" para realizar la validación de la técnica propuesta. En la **Tabla 1** se presentan los criterios de aceptabilidad de los parámetros considerados para la validación.

2.6. Aptitud para la técnica analítica desarrollada

Se participó de un ensayo interlaboratorio FAPAS® 04312 para determinación de fumonisinas B₁, B₂ y fumonisinas totales (B₁ + B₂ + B₃) en harina de maíz.

Tabla 1. Parámetros de validación y sus criterios de aceptabilidad.

Parámetro a evaluar		Criterio de aceptabilidad
Linealidad		Capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta que sea proporcional a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. Coeficiente de determinación lineal (R ²) ≥ 0,97
Precisión	Repetibilidad (en 3 niveles)	Precisión para obtener resultados de ensayos independientes con el mismo método, idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo, el mismo operador. Coeficiente de Variación por operador (CV) ≤ * Coeficiente de Horwitz
	Reproducibilidad intermedia (en 3 niveles)	Condiciones donde los resultados se obtienen con el mismo método en matrices idénticas de análisis en condiciones diferentes ya sea diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros. Coeficiente de Variación (CV) ≤ * Coeficiente de Horwitz
Veracidad	Recuperación	Es el porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperada durante el procedimiento analítico en tres niveles de la curva de calibración: máximo, medio y bajo. Porcentaje de Recuperación: 60% - 120%
Límites Analíticos	LOD	Concentración mínima de analito que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificada mediante un valor exacto. Concentración que presente una relación señal/ruido > 3
	LOQ	Concentración mínima del analito que puede determinarse con seguridad estadística (en términos de exactitud - precisión y veracidad - aceptable). Concentración que presente una relación señal/ruido > 10
Selectividad		Grado en que un método puede cuantificar o cualificar al analito en presencia de interferentes. Cromatogramas libres de señales interferentes

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se estandarizaron las condiciones de extracción de la muestra, de derivatización y análisis cromatográfico (Tabla 2). El punto de partida fue la metodología oficial AOAC 995.15 con ligeras modificaciones que permitieron obtener porcentajes de recuperación adecuados (dentro del rango recomendado por el Reglamento CE N° 401/2006).

Tabla 2. Condiciones operativas utilizadas en el método analítico desarrollado.

Solvente de extracción	Metanol:Agua 1:1 (v/v)
Fase móvil (FM)	Metanol:Buffer acetato de sodio 5 mM 71:29 (v/v)
Flujo de FM	1,5 ml/minuto
Temperatura de columna	40°C
Etapas de derivatización on-line	40 µl solución derivatizante + 10 µl de muestra Tiempo de reacción: 2 minutos

Se realizó el análisis de los parámetros de validación, pudiendo cumplir con todos los criterios de aceptabilidad previamente mencionados (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos en la validación analítica de la metodología.

Parámetro a evaluar	Fumonisina										
	B ₁			B ₂			B ₃				
Linealidad	R ² = 0,9867			R ² = 0,9805			R ² = 0,9758				
Precisión	Niveles	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3	
		Repetibilidad (%)	OP 1	3,8	5,6	5,0	3,7	9,0	8,6	6,5	8,3
	OP 2	2,7	8,7	3,3	4,3	8,7	2,9	4,9	0,4	1,8	
	Reproducibilidad intermedia (%)	3,1	7,8	4,4	9,5	11,6	7,3	7,7	9,5	6,8	
Veracidad	Recuperación (%)	104			88			79			
Límites Analíticos	LOD (µg/kg)	1,5			6,7			2,3			
	LOQ (µg/kg)	5,1			16,3			5,6			
Selectividad	No se observaron interferencias para ninguna de las fumonisinas analizadas.										

Se evidenció la selectividad (Figura 1), confirmando la capacidad del método analítico de separar, detectar y cuantificar las fumonisinas en presencia de otros componentes e impurezas de la matriz. El orden de elución de las fumonisinas fue FB₁, FB₃ y FB₂; los tiempos de retención

7,0 ± 0,2 min., 16,8 ± 0,4 min. y 18,6 ± 0,4 min., respectivamente, y todas las micotoxinas presentaron una buena resolución cromatográfica. En cuanto a la prueba de aptitud, se aprobó exitosamente el interlaboratorio FAPAS® 04312.

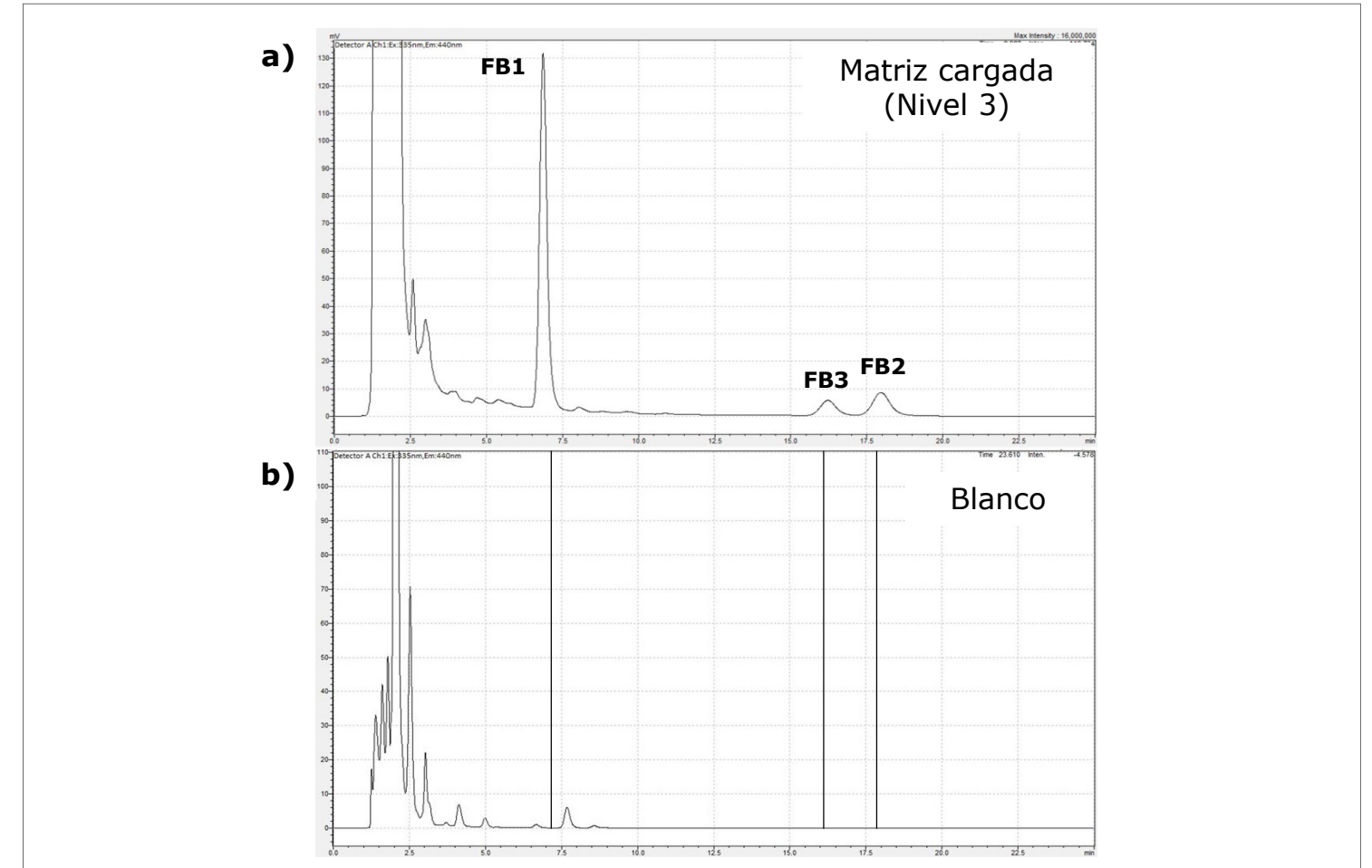


Figura 1. Cromatogramas característicos de: a) matriz cargada y b) blanco

4. CONCLUSIÓN

A partir de la información presentada se puede observar que el método analítico propuesto aporta una herramienta robusta, eficaz y confiable para el análisis de fumonisinas en alimentos a base de maíz; ampliando la capacidad analítica del Departamento Control y Desarrollo del INAL – ANMAT.

5. BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. (2000). AOAC Official Method 995.15. Fumonisin B1, B2 and B3 in Corn.
- COMISION EUROPEA. (2006). Reglamento CE N°1881/2006 de la Comisión.
- COMISION EUROPEA. (2006). Reglamento CE N°401/2006 de la Comisión.
- Coronel, M. B., Vicente, S., Resnik, S. L., Alzamora, S. M., & Pacin, A. (2016). Fumonisin in maize and gluten meal analysed in Argentinean wet milling industrial plants by ELISA compared with HPLC-FLD method. *Food Control*, 67, 285-291.

- Eurolab España. (2016). "Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados". *Eurachem*, 66 pág.
- JECFA and FAO. (2012). *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*. World Health Organization, 101 pág.
- Ndube, N., Van Der Westhuizen, L., & Shephard, G. S. (2009). *Determination of fumonisins in maize by HPLC with ultraviolet detection of o-ph thaldialdehyde derivatives*. *Mycotoxin Research*, 25(4), 225-228.
- Waskiewicz, A., Beszterda, M., & Goliński, P. (2012). *Occurrence of fumonisins in food - An interdisciplinary approach to the problem*. *Food Control*, 26(2), 491-499.

METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA EL ANÁLISIS DE MULTIRRESIDUOS DE PESTICIDAS EN HARINA DE TRIGO Y PRODUCTOS DERIVADOS

Pietronave, Jonatan; Villafañe, Virginia; Maseda, Juan Pablo; D'Espósito, Lourdes; Ruarte, Silvana; Garbini, Adriana; De Nicola, Matías.
Departamento Control y Desarrollo. Dirección de Fiscalización, Vigilancia y Gestión de Riesgo.
Instituto Nacional de Alimentos (INAL – ANMAT)
ldesposito@anmat.gov.ar

RESUMEN

La utilización de pesticidas en distintas etapas de la cadena productiva del trigo es una práctica ampliamente difundida para mitigar el impacto negativo que las plagas producen sobre el rendimiento de las cosechas. La presencia de residuos de pesticidas en alimentos listos para el consumo implica un riesgo sanitario para la población.

El presente trabajo busca contribuir al fortalecimiento del Sistema Nacional de Control de Alimentos, mediante el aporte de un método analítico validado para la determinación de multirresiduos de pesticidas en harina de trigo y productos derivados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

El método desarrollado y validado incluyó 10 residuos de pesticidas cuyo uso es habitual a lo largo de la cadena productiva del trigo. Se trabajó con la metodología QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) para la extracción y purificación de las muestras.

Según el análisis de los parámetros de validación, la metodología fue adecuada para la determinación de 9 de los compuestos incluidos. Para el buprofezín, analito para el cual se obtuvieron bajos niveles de recuperación, se sugiere el análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS).

1. INTRODUCCIÓN

Aunque el uso de pesticidas logre reducir el impacto negativo que las plagas causan en los cultivos, no pueden desconocerse los perjuicios que pueden causar en la salud humana y en el ambiente. La consecuencia negativa de su utilización, relacionada directamente con el eje de este trabajo, es la presencia de sus residuos en los alimentos listos para el consumo, lo que impacta directamente en la inocuidad y calidad alimentaria, repercutiendo en la salud de la población en general. Son diversos los factores que contribuyen a esta situación, principalmente, la utilización de diversas combinaciones de formulaciones a base de principios activos cuya persistencia en los suelos es prolongada por no ser degradados por las condiciones ambientales a las que quedan expuestos. El desarrollo de metodologías analíticas adecuadas para su determinación es fundamental para que las autoridades sanitarias puedan cumplir su rol de fiscalización.

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de multiresiduos de pesticidas en harina de trigo y productos a base de trigo por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Selección de analitos.

Se eligieron 10 principios activos para incluir en el método de análisis, para lo cual se tuvieron en cuenta datos de la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFA) sobre la comercialización de productos fitosanitarios para trigo, recomendaciones de aplicación de fabricantes o importadores de agroquímicos de Argentina y antecedentes de hallazgos de residuos de pesticidas en alimentos a base de trigo. Los compuestos seleccionados fueron dimetoato, metalaxyl, malatión, azoxystrobina, tebuconazole, diazinón, pirimifós metil, buprofezín, imidacloprid y pirimicarb.

2.2. Reactivos, solventes y soluciones utilizadas

Se trabajó con estándares de pesticidas (Fluka) de pureza mayor a 95%. Se utilizó acetato de etilo para cromatografía gaseosa (*Merck*) como diluyente para preparar diferentes soluciones de estándares. Se empleó metanol grado LC/MS (*Merck*) y agua bidestilada (purificador *PURELAB* serie *Classic*. *ELGA*) como fase móvil, con formiato de amonio 5 mM (*Sigma-Aldrich*) y ácido fórmico 0,0012% (*Sigma-Aldrich*).

Se trabajó con el método QuEChERS (*Supelco*). La etapa de extracción, se realizó con acetonitrilo para análisis (*Sintorgan*), acidificado con ácido acético glacial (*Anedra*). Se utilizaron sales de extracción del método modificado por la AOAC (6 g de sulfato de magnesio y 1,5 g de acetato de sodio). Para la etapa de purificación, se utilizaron 50 mg de *Discovery* DSC-18 (C18), 50 mg de GCB (ENVI-Carb), 150 mg de sulfato de magnesio y 50 mg de PSA.

2.3 Preparación de estándares

A partir de los estándares comerciales de pesticidas, se prepararon soluciones stock de cada principio activo, en acetato de etilo, a concentraciones de 1000 µg/ml. A partir de ellas, se preparó una solución mix de todos los compuestos a una concentración de 10 µg/ml. Esta solución fue utilizada para realizar la curva testigo en metanol grado LC/MS y para cargar blancos de matriz para evaluar la recuperación de la técnica. Todas las soluciones fueron almacenadas a -20°C.

2.4 Condiciones cromatográficas

Se trabajó con un cromatógrafo líquido con detector de masas de triple cuadrupolo marca *Agilent Technologies*, modelo 6460 y columna cromatográfica ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2,1x100mm, 1,8 µm) *Agilent Technologies*. Las condiciones cromatográficas se presentan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas.

Condiciones
Fase móvil: Solvente A. Agua, formiato de amonio 5mM, ácido fórmico 0,012 %. Solvente B. Metanol, formiato de amonio 5mM, ácido fórmico 0,012%.
Rampa de trabajo De 0 a 0,5 minutos: 94% de solvente A y 6% de solvente B. De 18 a 20 minutos: 5% de solvente A y 95% de solvente B. De 21 a 25 minutos: 100% de solvente B.
Flujo: 0,4 ml/min.
Volumen de inyección: 5 µL.
Temperatura de columna: 40 °C.

2.5 Parámetros del espectrómetro de masas

Tabla 2. Parámetros del espectrómetro de masas.

Parámetros	
Fuente de iones: electrospray (ESI)	Polaridad: positiva
Temperatura del gas: 300 °C	Flujo del gas: 5 l/min.
Nebulizador: 45 psi.	
Temperatura del gas envolvente: 250 °C.	Flujo del gas envolvente: 11 l/min.
Voltaje del capilar: 3000 V.	
Método de escaneo: monitoreo de reacciones múltiples dinámico. (DMRM)	
Voltaje de la celda de aceleración: 7V.	
Fragmentador: entre 80 y 380 V.	

2.6 Optimización de los analitos

En una primera etapa se trabajó con diluciones de las soluciones stock de cada uno de los pesticidas seleccionados, para optimizar las energías de fragmentación (EF) y de colisión (EC) y así obtener las transiciones de masas más abundantes de cada pesticida. A continuación se procedió a determinar sus tiempos de retención.

Luego, se prepararon soluciones de trabajo, compuestas por entre 4 y 5 pesticidas cada una, para poder evaluar el desempeño de los parámetros seleccionados para la detección por espectrometría de masas.

Finalmente, se preparó la "solución mix", conteniendo todos los pesticidas objeto de este trabajo, a partir de la cual se realizaron todas las diluciones necesarias para la validación.

2.7 Curva de calibración

A partir de la solución mix, se establecieron 9 niveles para las curvas de calibración de cada pesticida: 1; 1,67; 3,34; 5,01; 6,68; 16,7; 26,7; 40 y 50 ng/ml, que, según la técnica de procesamiento de la muestra que se detalla a continuación, corresponden a los puntos: 3 (N1); 5 (N2); 10 (N3); 15 (N4); 20 (N5); 50 (N6); 80 (N7); 120 (N8) y 150 (N9) µg/kg, respectivamente.

2.8 Preparación de la muestra y procedimiento de extracción

Se tomó una porción de muestra blanco de 5 gramos y se hidrató con 10 ml de agua. Se agregaron 15 ml de acetonitrilo con 1% de ácido acético y se adicionaron las sales de extracción del método de la AOAC (6 gr. de sulfato de magnesio y 1,5 gr. de acetato de sodio). Se transfirieron 2 ml del sobrenadante a un tubo de 5 ml con las sales de dispersión (50 mg de PSA, 150 mg de sulfato de magnesio, 50 mg de C18 y 50 mg de

GCB), se centrifugó y se tomó una alícuota para el análisis en el instrumental.

Para evaluar la recuperación de la técnica se cargó la matriz en los niveles correspondientes a 3, 10, 20, 80 y 150 µg/kg de la curva, comparando estos resultados cromatográficos con las curvas testigo realizadas para los mismos niveles.

2.9 Validación analítica

Se evaluaron los parámetros de especificidad, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad intermedia), veracidad (recuperación) y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), según los criterios de aceptabilidad establecidos en la guía SANTE para la validación de métodos analíticos de pesticidas en alimentos y piensos.

3. RESULTADOS

3.1 Optimización de los analitos

Se obtuvieron los siguientes resultados de optimización:

Tabla 3. Transiciones optimizadas de los analitos.

Pesticida	Ion Precursor	EF (V)	Producto 1	EC (eV)	Producto 2	EC (eV)
Dimetoato	230,3	92	199,0	2	125,0	18
Metalaxyl	280,3	92	220,1	10	160,1	22
Malatión	331,4	92	127,0	6	99,0	18
Azoxystrobina	404,4	92	372,1	6	344,1	22
Tebuconazole	308,2	160	70,1	22	125,0	22
Diazinón	305,4	92	169,1	18	153,1	18
Pirimifós metil	306,3	164	164,1	18	108,1	30
Buprofezin	306,4	92	201,1	6	116,0	10
Imidacloprid	256,0	100	175,2	12	209,2	12
Pirimicarb	239,2	92	182,1	10	85,2	26

3.2 Parámetros de validación

Selectividad. Se demostró ausencia de señal en el blanco de muestra, en contraste con las señales obtenidas en muestras fortificadas (figura 1), lo cual comprueba la selectividad de la metodología.

Linealidad. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos verifican la linealidad entre la concentración de cada analito y la intensidad de la señal. Los valores se muestran en la Tabla 4.

LOD y LOQ. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Repetibilidad. Los coeficientes de variación (CV%) estimados para cada nivel y operador evaluado, de cada analito, fueron menores al CV% de

Horwitz para repetibilidad obtenido, con lo cual se cumplió el criterio de aceptabilidad.

Precisión intermedia. Los CV% para reproducibilidad intralaboratorio estimados para cada nivel evaluado, de cada analito, fueron menores al CV% de Horwitz para reproducibilidad intralaboratorio obtenido, con lo cual se cumplió el criterio de aceptabilidad.

Recuperación. En la tabla 4 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada compuesto en los niveles 1, 3, 5 y 9.

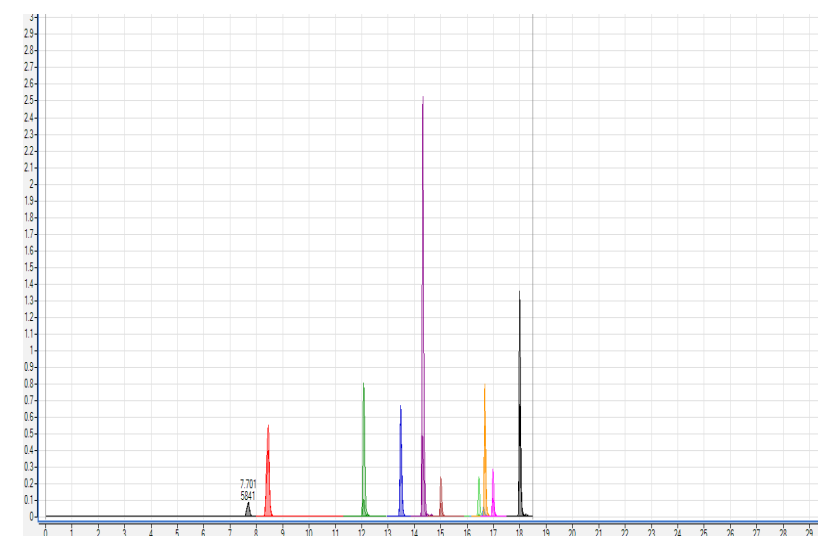


Figura 1. Muestra fortificada.

Tabla 4. Resultados de parámetros de validación.

Pesticida	R^2	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	Recuperación (%)				
				N1	N3	N5	N7	N9
Dimetoato	0,989	0,16	0,94	87	90	71	100	110
Metalaxyl	0,994	0,15	0,66	91	88	91	86	81
Malatión	0,994	0,42	2,08	57	59	56	62	65
Azoxystrobina	0,998	0,12	0,49	109	89	57	101	97
Tebuconazole	0,982	0,32	1,46	137	97	87	98	98
Diazinón	0,983	0,26	1,02	82	72	68	86	81
Pirimifós Metil	0,992	0,28	0,97	63	65	60	65	63
Buprofezin	0,989	0,08	0,21	26	21	19	20	17
Imidacloprid	0,982	0,09	0,70	129	111	85	102	190
Pirimicarb	0,990	0,23	0,75	80	76	77	75	71

4. CONCLUSIONES

Los parámetros de validación analizados superaron los criterios de aceptabilidad establecidos para todos los compuestos, excepto para el buprofezin, para el que se obtuvieron bajos porcentajes de recuperación. Respecto a este compuesto, se recomienda evaluar su recuperación utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS).

Actualmente, el Código Alimentario Argentino (C.A.A) no establece Límites Máximos de Residuos (LMR) de pesticidas en harina de trigo y productos derivados. Por ello, el desarrollo de metodología analítica con altos niveles de sensibilidad y especificidad, como la que hemos desarrollado, es una herramienta fundamental para generar evidencia científica que justifique la necesidad de incorporar LMR de pesticidas en este tipo de productos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed.* SANTE/11945/2015. European Commission.
- Rejczak, T. & Tuzimski, T. (2015). *A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach.* *Open Chem.*; 13: 980–1010.
- Control de las plagas en la agricultura argentina. Estudio Sectorial Agrícola Rural. Banco Mundial. Centro de Inversiones. FAO. Año 2005.
- Los plaguicidas en la República Argentina. Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Ministerio de Salud de la Nación. Edición 2014.
- Validación de métodos y determinación de la incertidumbre: "Aspectos generales sobre la validación de métodos". Instituto de Salud Pública Chile. Año 2010.

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS) PARA EL ANÁLISIS DE BENZODIACEPINAS EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS

Mariela Baldut, Eduardo Saint Martin, Matías Gómez, Marta Spinetto
 Departamento de Química y Física, Dirección de Fiscalización y Gestión de Riesgos,
 Instituto Nacional de Medicamentos, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.
 mariela.baldut@anmat.gob.ar - esaintmartin@anmat.gob.ar

RESUMEN

Las benzodiazepinas son psicofármacos sintéticos que poseen las siguientes propiedades farmacológicas: son ansiolíticos, sedativos, hipnóticos. Suelen ser utilizadas como drogas de abuso, por lo que es necesario un exhaustivo control de la venta y uso porque generan gran tolerancia y dependencia. Con la finalidad de generar una base de datos propia, se incorporaron espectros de masas de diversas sustancias de interés farmacológico y toxicológico a la biblioteca del cromatógrafo gaseoso que tiene acoplado un detector espectrométrico de masas. Se desarrolló una metodología para la detección e identificación de benzodiazepinas, ya que se pueden aislar los analitos de interés mediante una extracción líquido-líquido y luego analizar por cromatografía gaseosa. Puede ser aplicable en primera instancia para la búsqueda de analitos conocidos o no declarados en muestras de diverso origen que ingresan al Laboratorio Nacional de Control, para posteriormente continuar el análisis utilizando técnicas farmacopeicas u otros métodos para la cuantificación de benzodiazepinas. Es por ello que puede ser considerada como una técnica confirmatoria y/o complementaria. Mediante esta metodología de *screening* general por GC-MS se determina simultáneamente gran parte de las benzodiazepinas, siendo aplicable para el análisis de distintos tipos muestras lo cual permite dar una rápida respuesta acerca de la identidad química de los analitos.

Palabras claves: Benzodiazepinas, Cromatografía Gaseosa y Espectrometría de Masas, Desarrollo, Extracción Líquido-Líquido, Productos Farmacéuticos.

1. INTRODUCCIÓN

Las benzodiazepinas son entidades químicas de origen sintético, las cuales tienen actividad sobre el sistema nervioso central, con efectos sedantes, hipnóticos, ansiolíticos, anticonvulsivos, anestésicos y miorrelajantes. Se utilizan para el tratamiento de las patologías como la ansiedad, insomnio y otros estados afectivos, así como también para el tratamiento de epilepsias, abstinencia alcohólica y espasmos musculares. Suelen ser utilizadas como drogas de abuso, por lo que es necesario un exhaustivo control de la venta y uso ya que generan gran tolerancia y dependencia.

La primera parte del proyecto consistió en generar e incorporar espectros de masas de diversas sustancias de interés farmacológico y toxicológico a la biblioteca del cromatógrafo gaseoso que tiene acoplado un detector espectrométrico de masas. Teniendo en cuenta que el Departamento de Química y Física del Instituto Nacional de Medicamentos (INAME) es el área que realiza el análisis de las muestras correspondientes a oficios judiciales, pericias, especialidades medicinales y diversos productos

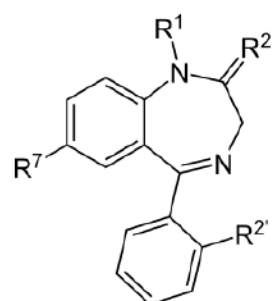


Figura 1- Estructura general de las benzodiazepinas: Compuesta por un anillo de benceno fusionado a un anillo de diazepina de 7 miembros y un sustituyente 5-arilo. Los sustituyentes indicados como Rx corresponden a grupos sustituyentes que varían según la benzodiazepina, lo cual determina la potencia.

farmacéuticos, es fundamental contar con una completa base de datos, siendo la finalidad dar una rápida respuesta acerca de la identidad química de los analitos.

Posteriormente, se desarrolló una metodología para el análisis de benzodiazepinas por GC-MS. Es importante contar con una técnica de *screening* general, en la que puedan determinarse simultáneamente gran parte de las benzodiazepinas en una muestra de origen desconocido, aplicable para el análisis de distintos tipos muestras. Una metodología complementaria y/o confirmatoria, puede contribuir a la rápida detección e identificación, además de establecer un lineamiento de trabajo en la búsqueda y análisis de sustancias conocidas y desconocidas.

2. OBJETIVOS

Desarrollar una metodología para la detección e identificación de benzodiazepinas en productos farmacéuticos y muestras de origen desconocido, utilizando Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas.

Generar espectros de masas de principios activos de interés farmacéutico y toxicológico para incorporar a la biblioteca del cromatógrafo gaseoso acoplado a un detector de masas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Equipo: cromatógrafo de gases con detector espectrométrico de masas y de Ionización en llama (FID), marca Shimadzu, Modelo QP-2010 Ultra, con el Sistema de Datos GC-MSSolution, equipado con una base de datos. Inyector automático AOC 20i, Muestreador automático Headspace Teledyne Tekmar HT3. Cuenta con una línea de gas carrier (Tipo Supelco 2-7600-U) y trampa para línea de gas make-up (Tipo Supelco 2-7600-U). Se utilizó una columna capilar 95% dimetilpolisiloxano/5% fenil-polisiloxano (29,8m x 0,25 mm ID -0,25µm), Marca Restek ZB-5MS, lote: 7H6-G010-11/Serie N°294703/Código N32, límite mínimo -60°C y límite máximo 325/350°C).

3.1 Biblioteca de Estándares de Benzodiazepinas

Soluciones de concentración de 0,1 mg/ml de cada una de las benzodiazepinas utilizando cloroformo como solvente. Corridas por cromatografía gaseosa para la incorporación de espectros de masas a la biblioteca del cromatógrafo gaseoso.

3.2 Desarrollo de la metodología analítica

Para establecer las condiciones de análisis de múltiples benzodiazepinas por cromatografía gaseosa acoplado a un detector de masas, se realizaron pruebas utilizando una solución estándar de concentración de 0,1 mg/ml de cada una de las benzodiazepinas.

***Estándar Interno.** Solución clorofórmica de Amitriptilina de concentración 0,25 mg/ml. El índice de retención es 2284, menor al de los principios activos de interés.

***Solución estándar.** Se pesó 2,0 mg del estándar de referencia, se transfirió a un matraz de 20 ml y se agregó 14 ml de cloroformo. Una vez disuelto se añadió 2 ml de estándar interno y llevó a volumen con el mismo diluyente (concentración 0,1 mg/ml).

Para *Zolpidem*, se utilizó como diluyente solución de carbonato de sodio 2,0%p/v., llevando a volumen final de 10 ml. Se extrajo con 3 ml de cloroformo, repitiendo el procedimiento 2 veces más. Se reunieron los extractos obtenidos en un matraz de 10 ml, se añadió 2 ml de estándar interno y se llevó a volumen con solvente orgánico.

***Preparación de la muestra.** Se llevó a polvo fino la muestra a analizar, tomando el peso equivalente a 1 mg del principio activo. Se transfirió a un matraz de 10 ml y se añadió 7 ml de solución de carbonato de sodio al 2%. Se sonicó 10 minutos y se llevó a volumen con el mismo diluyente. Se trasvasó la totalidad de la solución muestra a un erlenmeyer de 25 ml y se añadió 5 ml de cloroformo. Se agitó mecánicamente durante 2 minutos a 300 rpm. Se trasvasó a una ampolla de decantación y se agitó vigorosamente para extraer los analitos. Se separó la fase acuosa del extracto clorofórmico. Se añadió 3 ml de cloroformo a la fase acuosa, realizó una segunda extracción y se agregó cloruro de sodio. Se reunieron los extractos en un matraz de 10 ml y se agregó 2 ml de estándar interno. Finalmente se llevó a volumen con cloroformo.

3.3 Parámetros de Validación considerados

***Matrices de benzodiazepinas.** Se prepararon matrices al 1% de cada uno de los principios activos, utilizando excipientes comunes y cantidades de fórmulas comerciales. Fórmula por unidad (comprimido): Principio Activo (Benzodiazepina) 1,91 mg; Almidón Glicolato 2,00 mg; Celulosa Microcristalina 50,00 mg; Lactosa Monohidrato 127,00 mg; Croscarmelosa Sódica 10,00 mg.

***Selectividad.** Determinada por el detector espectrométrico de masas acoplado al cromatógrafo gaseoso. Este permite la detección inequívoca de un analito a partir de la correspondencia con el espectro de masas de referencia que se encuentra incorporado a la biblioteca del equipo. A partir del índice de similitud se puede confirmar la identidad.

***Linealidad.** Se consideró cinco niveles, abarcando el rango de 50%-150% de los IFAs de interés, siendo el valor nominal una concentración de 0,1 mg del principio activo (100%).

***Recuperación.** Se trabajó sobre muestras al 100% de la concentración nominal utilizando la técnica y condiciones establecidas previamente.

***Límite de Detección (LD) y Cuantificación (LC).** Se prepararon soluciones diluidas de cada uno de los analitos, para obtener una relación señal/ruido mayor 3 para LD y mayor a 10 para LC.

4. RESULTADOS

4.1- Biblioteca de Estándares de Benzodiazepinas

Se incorporaron trece espectros de masas de referencia a la biblioteca INAME: Alprazolam, Bromazepam, Clodiazepóxido, Clonazepam, Diazepam, Desoxiclodiazepóxido (sust. relac. de Clodiazepóxido), Flunitrazepam, Nordazepam, Lorazepam, Midazolam, Triazolam, Zolpidem, Zopiclona.

4.2 Desarrollo de la metodología analítica

Se establecieron las condiciones para el análisis de múltiples benzodiazepinas por cromatografía gaseosa acoplado a un detector de masas, alcanzando la resolución de los analitos de interés.

● Cromatografía Gaseosa (GC)

Tiempo (min)	Temp. final (°C)	Velocidad (°C/min)
2,00	240,0	---
0,00	280,0	4,00
0,00	290,0	5,00
3,00	300,0	20,00

Temperatura del horno 240°C, temperatura del Inyector 285°C, tiempo de corrida programado 15.5 min, modo de inyección Split, relación de split 5.0, gas carrier Helio, flujo 4.0 ml/min, presión 250.0 kPa, velocidad lineal de 40,0 cm/s.

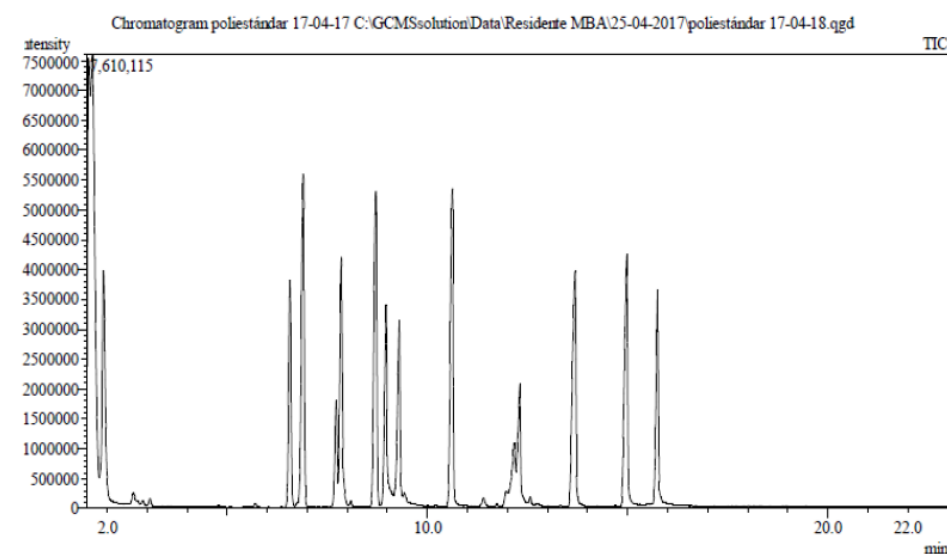


Figura 2. Registro de Corriente Iónica Total (TIC) del poliestándar.

Orden de elución e índices de retención: Lorazepam (2528), Diazepam (2556), Nordazepam (2625), Desoxiclodiazepóxido (sust. relac. de Clodiazepóxido), Midazolam (2722), Flunitrazepam (2744), Bromazepam (2760), Olanzapina (2861), Zolpidem (2941), Clodiazepóxido (2981), Clonazepam (3000), Alprazolam (3108), Triazolam (3219), Zopiclona (3263).

● Espectroscopía de Masas (MS)

Start Time (min)	2,00
End Time (min)	15,50
Adq. Mode	SCAN
Event Time(sec)	0,03
Scan Speed	2500
Start m/z	40,0
End m/z	450,0

Temperatura de la fuente de iones 300°C, temperatura de la interfase 300°C, cut off del solvente 2 min, voltaje del detector relativo al resultado absoluto del *tuning* (-0.9 mV), límite/threshold 10.

4.3- Parámetros de Validación

Se trabajó con soluciones estándar de cada uno de los analitos y matrices simuladas para evaluar los distintos parámetros de validación.

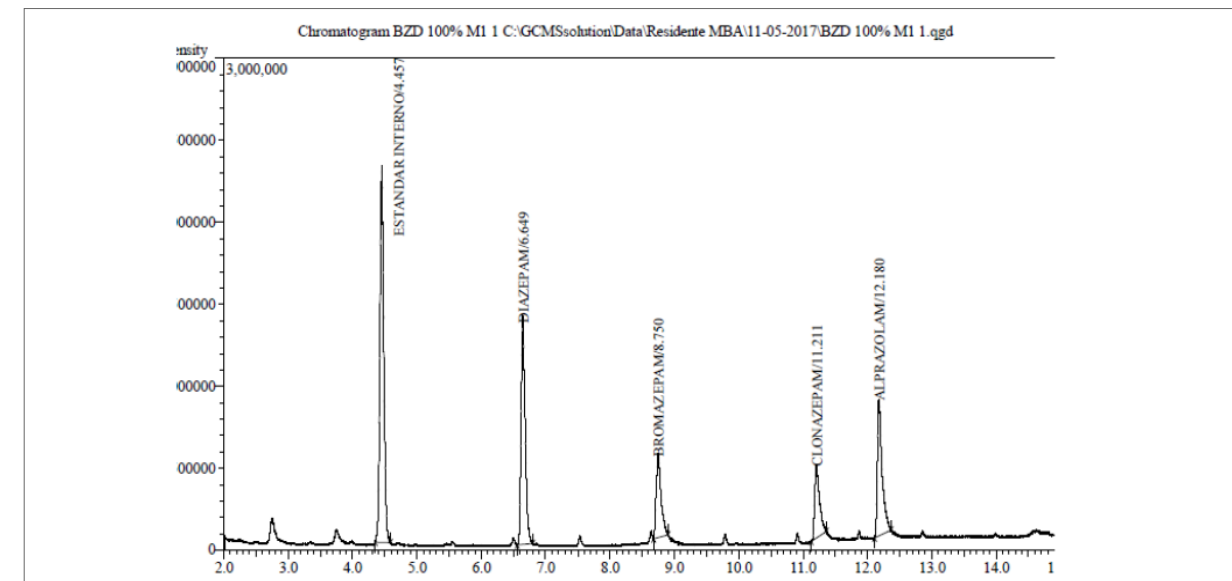


Figura 3. Registro TIC de la matriz 1 preparada, análisis empleando la metodología desarrollada.

***Selectividad.** Los registros de corriente iónica total (TIC) no presentan interferencias. El espectro de masas de cada uno de los analitos se corresponde con el de referencia (los cuales están incorporados a la biblioteca del equipo). En todos los casos, el índice de similaridad fue mayor a 98,0.

***Linealidad.** Inicialmente se trabajó con doce benzodiazepinas. Sin embargo siete presentan curvas de acuerdo a los parámetros establecidos para linealidad, por lo cual se reportan los resultados de: Alprazolam, Bromazepam, Clonazepam, Clodiazepóxido, Diazepam, Midazolam, Zolpidem.

En el caso de clodiazepóxido y zolpidem se pudo verificar 4 niveles. De todas maneras, se decidió estudiar el rango 75%-150% de la concentración terapéutica tomando como consideración de que las especificaciones para productos terminados contemplan el rango 90,0-110,0%.

***Recuperación.** Fue adecuada en la mayoría de los casos. Dado que se aplica un método de *screening* general, las condiciones deberán optimizarse para cada principio activo en particular una vez identificados (por ejemplo: pH del diluyente, solvente de extracción, etc.). El procedimiento de extracción de los analitos es un factor importante para la recuperación.

***Límite de Detección y Límite de Cuantificación.** Los resultados obtenidos se encuentran en el orden de los microgramos (concentraciones µg/ml), lo cual refleja que se pueden identificar las distintas benzodiazepinas a bajas concentraciones en las muestras de interés.

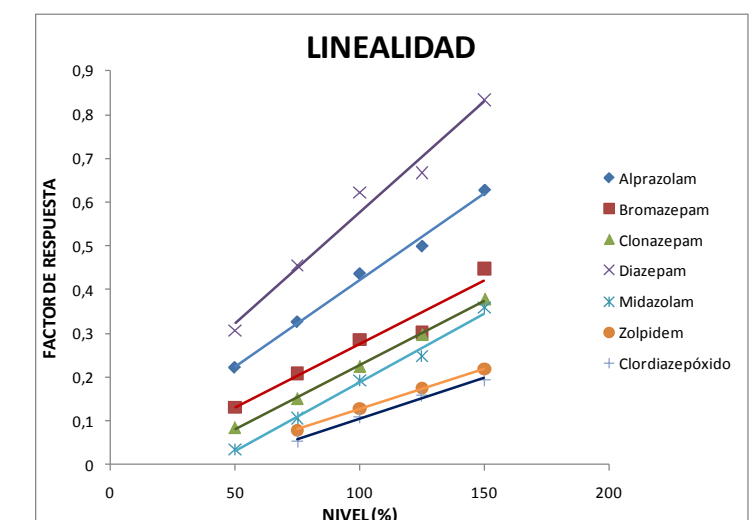


Gráfico 1. Linealidad: benzodiazepinas

En los resultados obtenidos en el análisis del test t-student, todas las benzodiazepinas cumplen con las hipótesis establecidas: pendiente diferente de cero y el coeficiente de correlación no significativamente distinto de cero, lo cual comprueba que el sistema posee un comportamiento lineal. Además se acepta la hipótesis nula para la ordenada al origen (intercepto no es significativamente diferente de cero).

En el análisis de varianza (ANOVA) para cada curva de calibración de las benzodiazepinas, el valor de F hallado es mayor que el valor crítico de F con cual podemos establecer que la pendiente es significativamente diferente de cero para cada curva de calibración de cada benzodiazepina, por lo tanto estas poseen un comportamiento lineal.

Tabla 1. Resultados obtenidos en la validación de la metodología analítica.

Benzodiacepina	Parámetros				
	Selectividad	Linealidad (R ²)	Recuperación (%)	LD (µg/ml)	LC (µg/ml)
Alprazolam	Espectro de masas se corresponde con el de referencia.	0,9922	94,7	3,00	10,00
Bromazepam		0,9457	77,8	2,25	7,50
Clonazepam		0,9988	73,4	2,18	7,27
Clordiazepóxido		0,9903	58,6	3,75	12,50
Diazepam		0,9769	95,3	1,34	4,49
Midazolam	Índice de Similaridad ≥98	0,9904	79,0	2,73	9,09
Zolpidem		0,9990	57,1	2,00	6,67

5. CONCLUSION

Se incorporaron trece espectros de masas a la biblioteca del cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrometría de masas, de manera que se creó una base de datos propia para la búsqueda de analitos. Esto se realizó a partir del análisis de soluciones estándar de benzodiacepinas de concentración 0,1 mg/ml, siendo este valor el adecuado ya que las señales no presentan asimetría y/o ápices poco definidos como suele suceder en los casos de sobre carga de la columna. Se lograron mejoras en los valores de índices de similaridad con los nuevos espectros de referencia (comparativamente con la biblioteca que trae incorporada el equipo), lo cual permite dar una mayor certeza a la identificación. A 285°C se obtuvieron registros aceptables en cuanto al comportamiento cromatográfico. Las condiciones propuestas para el análisis surgen de una situación de compromiso en la que debe alcanzarse el cumplimiento de todos los criterios analíticos.

Se desarrolló una metodología para la determinación de benzodiacepinas, la cual implica una extracción líquido-líquido y análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas utilizando condiciones adecuadas para la resolución de todos los componentes de interés. La misma puede ser considerada como complementaria a otros ensayos y confirmatoria en cuanto a la composición química de una muestra. Para la identificación se consideró la correspondencia con los espectros de masas de referencia del cromatógrafo y el valor del índice de similaridad. Las muestras se trataron a pH alcalino ya que a valores cercanos a 12 se facilita la extracción de las benzodiacepinas. Tanto el pH como el solvente de extracción son críticos porque impactan directamente en la recuperación. Se obtuvieron resultados que van desde el 50 al 90%. Se consideran aceptables a los fines cualitativos. Estos resultados son dependientes de las propiedades físico-químicas del analito, las condiciones de ensayo, su estabilidad y la matriz en la que se encuentra, entre otros factores. Es por ello que se recomienda que una vez determinada la composición de las muestras se efectúen los ajustes

necesarios respecto a concentración y características del analito de interés con el objeto de optimizar la calidad de los parámetros analíticos. En los casos en los que la recuperación fue baja sería importante considerar la precisión del método para estudiar la factibilidad de aplicar un factor de corrección. En la evaluación de linealidad del método analítico se obtuvieron coeficientes de correlación (R) y de determinación (R²) cercanos a uno, demostrando así que existe una relación entre la concentración de la benzodiacepina y el factor de respuesta. Además el método demostró poseer un alto grado de sensibilidad dados los bajos límites de detección logrados.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Poletini, A. *Systematic Toxicological Analysis of Drugs and Poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques.* *Journal of Chromatography B*, 733 (1999) 47–63 PII: S0378-4347(99)00264-9.
 - Shimadzu Corporation *Analysis of psychotropic drugs in whole blood utilizing simultaneous*
 - SCAN/MRM *measurements. Application data sheet number 45;* 2013.
 - Shimadzu Corporation *Simultaneous Analysis of 66 pesticides by GC-MS using hydrogen carrier gas. Application data sheet number 83.* (2013)
 - Shimadzu Corporation- Kadokami, K. *Development of novel automated Identification and Quantification System with a Database for GC-MS. Technical Report.* (2013)
 - Clarke's (s.f.)-*Analysis of drugs and poisons (4th Edition).* Published by Pharmaceutical Press (2011)
 - *United States Pharmacopeia -Edition 39* (2016). <1225> *Validation of analytical methods.* E.E.U.U.
- Recuperado el 22 de mayo del 2017, de www.uspnf.com/

REVISIÓN SISTEMÁTICA

CANNABINOIDES Y EPILEPSIA

Maria Laura Ferreiros Gago, Virgilio Petrunaro, Pablo Copertari, Norberto Barabini, Jimena Bugna, Vicentin, Roberto Lede.

Programa de Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

Contacto: virgilio.petrunaro@anmat.gov.ar

1. INTRODUCCIÓN

La epilepsia afecta a alrededor de 65 millones de personas en el mundo, con una incidencia de 20-70 casos nuevos por 10.000 individuos por año. En la actualidad, existen múltiples tratamientos antiepilépticos, pero ninguno de ellos es curativo.

El 30% de los pacientes son resistentes a los tratamientos antiepilépticos convencionales y presenta cuadros graves con mal pronóstico. En la actualidad, se observa una creciente presión por parte de los pacientes, familiares y de la sociedad en general para buscar alternativas terapéuticas no tradicionales para este tipo de cuadros, sumados a la información fácilmente accesible y al rol preponderante de las redes sociales y de los medios de comunicación.

En este contexto, los cannabinoides se posicionan como una opción terapéutica a considerar en estos pacientes; ello obliga a analizar, desde una perspectiva científica, la evidencia disponible sobre efectividad y seguridad de la utilización terapéutica del cannabis o de sus derivados en el tratamiento de la epilepsia.

Los dos principales cannabinoides biológicamente activos son el tetrahidrocannabinol (THC) y el cannabidiol (CBD). El THC es el compuesto psicoactivo más abundante en la planta, siendo el responsable de los cambios cognitivos y en la sensorialidad comúnmente asociados con el consumo de marihuana. La tolerancia y los efectos psicoactivos del THC son los factores críticos limitantes en el avance del potencial uso clínico del THC.

El CBD posee baja afinidad por los receptores CB1 y CB2, actúa contrarrestando algunos efectos psicoactivos del THC y mejora su tolerabilidad. Presenta efecto anticonvulsivante, antiinflamatorio y antitumorígeno. Debido a la ausencia de propiedades psicoactivas, la baja tasa en la que se desarrolla tolerancia, su buen perfil de seguridad en humanos, así como su eficacia en los estudios preclínicos y algunos resultados alentadores en las fases clínicas, sugieren que podría ser un fármaco seguro y eficaz para el tratamiento de la epilepsia.

2. OBJETIVO

Evaluar la eficacia y seguridad de los cannabinoides en el tratamiento de la epilepsia en pacientes de cualquier edad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

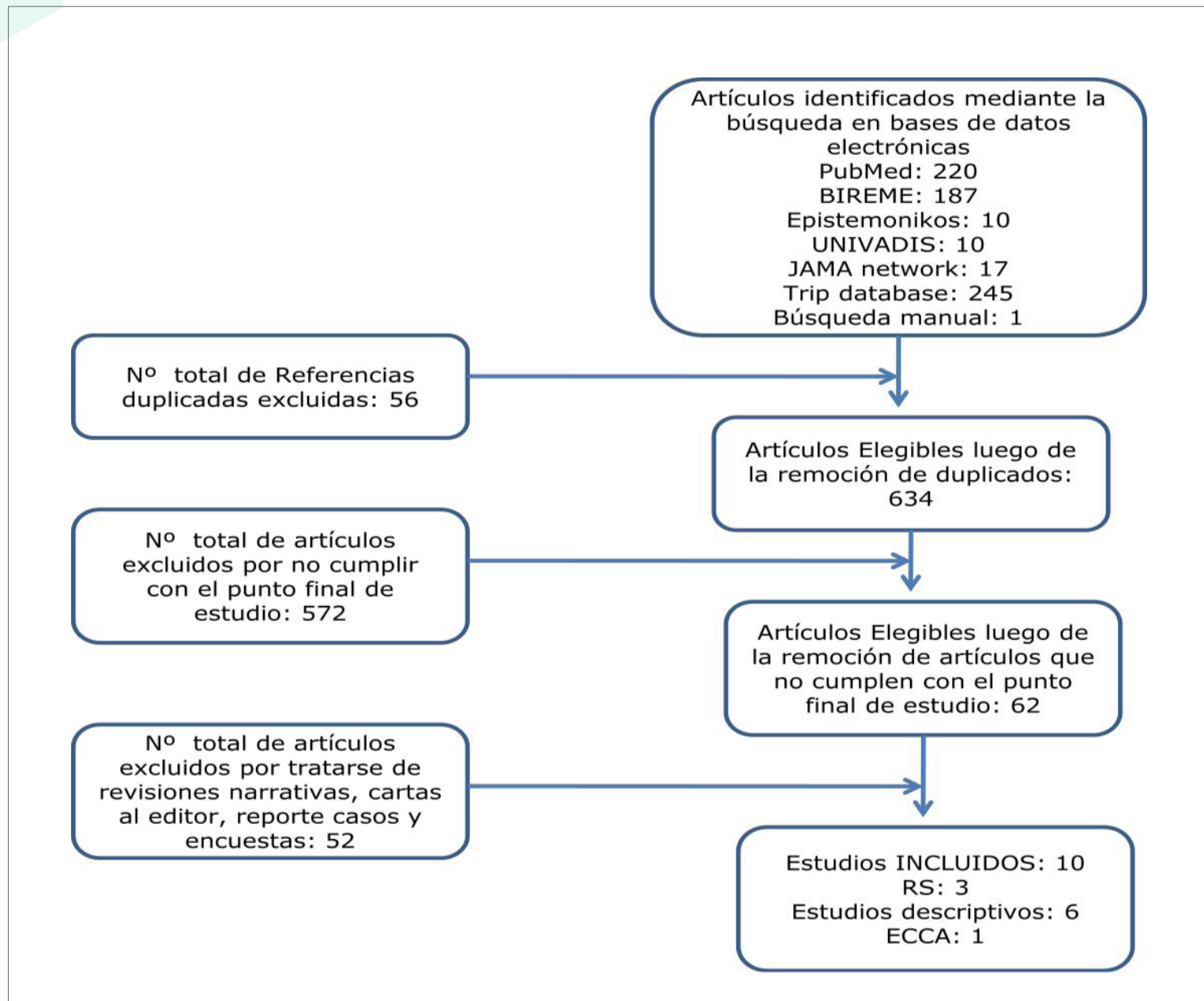
Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica utilizando las siguientes palabras clave: *cannabi** AND *epilepsy* y *cannabinoids* AND *epilepsy*. Límites: Seres humanos, sin restricción de lenguaje. Se exploraron bases de datos *Cochrane Collaboration*, PubMed, Biblioteca Virtual en Salud (BVS), Biblioteca Central de Medicina (RIMA), Epistemonikos, *Tripdatabase*, UNIVADIS, JAMA Network, Agencias de evaluación de tecnologías sanitarias, PROSPERO, Clinicaltrials.gov y búsqueda manual.

Se incluyeron 10 estudios de 634 encontrados, publicados entre 1974 y 2016 (3 revisiones sistemáticas, 6 estudios descriptivos y un ensayo clínico controlado) con los siguientes puntos finales: reducción en la frecuencia de convulsiones (la cual fue definida en algunos estudios como proporción de pacientes libres de convulsiones durante 12 meses, o tres veces el intervalo más largo sin convulsiones y/o proporción de pacientes que presentan reducción del ≥50% en la frecuencia de las convulsiones durante el período de mantenimiento) y eventos adversos.

4. RESULTADOS

El ECCA de Devinsky (2017) incluyó 120 pacientes con Síndrome de Dravet (SD). En el grupo que recibió CBD la frecuencia basal de las crisis convulsivas disminuyó un 40% en la mediana con respecto a la basal (R25-75 -69,5 a -4,8) y el 43% de los pacientes del grupo CBD presentaron una reducción >50% en la frecuencia de las convulsiones. Los pacientes tratados con CBD requirieron menor cantidad de fármacos de rescate. En una escala validada para evaluación por parte de los cuidadores, la diferencia en el estado general de los pacientes mejoró.

En el estudio de Devinsky (2016), prospectivo, abierto, de acceso am-



pliado que incluyó 214 pacientes, se observó un cambio de la mediana en las convulsiones motoras mensuales desde la línea de base de -36,5% (R25-75 -64,7 a 0) y 5 pacientes (4%) estuvieron libres de convulsiones motoras. Para todos los tipos de convulsiones, 37% de los pacientes tuvieron una reducción $\geq 50\%$, 22% reducción $\geq 70\%$ y 8% tuvieron una respuesta $\geq 90\%$. Para los pacientes con SD la reducción de la mediana mensual en las convulsiones motoras fue 49,8% (R25-75 -64,3 a -12,4). Para los pacientes con síndrome de Lennox-Gastaut (SLG) se registró una reducción en la mediana del 36,8% (R25-75 -60,3 a -18,8) en las convulsiones motoras y el 37% de ellos tuvieron una reducción $\geq 50\%$ en las convulsiones. El cambio de la mediana en las convulsiones mensuales totales de todos los tipos fue de -35,5% (R25-75 -55,1 a -16,4).

El estudio retrospectivo de Tzadok (2016) basado en registros de visitas clínicas y telefónicas, incluyó 74 pacientes con epilepsia refractaria. El 90% de los pacientes que recibieron CBD presentaron algún grado de reducción de la frecuencia de las convulsiones. El 46% de los pacientes informaron eventos adversos (EA) y el 14% debió suspender el tratamiento.

El resto de los estudios con los sesgos propios derivados de la baja calidad metodológica informaron mejoría franca de las convulsiones. La mayoría de los pacientes eran graves, con mucho tiempo de evolución y varios tratamientos con medicamentos antiepilépticos simultáneos, y la exposición al CBD ocurrió luego del fracaso de múltiples tratamientos realizados por años.

La mayoría de los estudios reportaron beneficios adicionales en el comportamiento; estado de alerta, lenguaje, las habilidades motoras, sueño, estado de ánimo y de los movimientos estereotipados.

Los EA informados en los estudios fueron leves a moderados y los más frecuentes ($>10\%$) fueron: somnolencia, disminución del apetito, diarrea, fatiga, convulsiones, cambios en el apetito, status epiléptico, letargia, cambios en las concentraciones de fármacos antiepilépticos concomitantes, alteración de la marcha y sedación. Los efectos adversos serios fueron infrecuentes.

5. DISCUSIÓN

En los dos estudios más recientes (Devinsky 2017 y 2016) se incluyeron un total de 334 pacientes con epilepsia refractaria, SD y SLG. Ello constituye una población extensa, cuando se la compara con la población incluida en el resto de los estudios realizados entre 1978 y 2016, que incluyen un total de 237 pacientes.

Con respecto a la eficacia, en el estudio de Devinsky et al (2017) se demostró que el 50% de los pacientes con Síndrome Dravet, en tratamiento con CBD, presentaron una reducción de aproximadamente el 40% en la frecuencia de las crisis convulsivas. Y, además, que el 50% de los pacientes presentaron una reducción de casi la mitad en la frecuencia de las convulsiones de todos los tipos. También se concluyó que los pacientes tratados con CBD requirieron menor cantidad de fármacos de rescate, y que tres pacientes permanecieron libres de crisis en el grupo tratado y ninguno en el grupo control.

En el estudio de Devinsky et al (2016) se observó que el 50% de los pacientes redujeron aproximadamente un 37% la frecuencia de las convulsiones motoras mensuales. El 39% de los pacientes presentaron una reducción $>50\%$ en la frecuencia de las crisis motoras y el 37% de los pacientes presentaron una reducción $>50\%$ para todos los tipos de convulsiones. El 56% de los pacientes con cuadros atónicos redujeron en más del 50% la frecuencia de las crisis, y casi el 10% de los pacientes permanecieron libres de convulsiones. En los pacientes con SLG se observó que el 50% logró una reducción cercana al 40% en la frecuencia de las crisis motoras; sin embargo, ningún paciente permaneció libre de crisis. Se redujeron los ataques atónicos, pero sin observarse reducción en las crisis tónico-clónicas. Sólo una minoría de los padres fueron capaces de proporcionar dosis específicas de CBD (es decir, mg de CBD por día).

Los cambios percibidos en la frecuencia de las crisis fueron observados rápidamente, pues el 86% de los pacientes informaron mejoría o empeoramiento dentro de los 14 días. También se han informado otros efectos beneficiosos del tratamiento con CBD, como son la mejoría observada en la conducta, alerta, lenguaje, comunicación y habilidades motoras.

Las encuestas realizadas a padres y cuidadores son concordantes con

los hallazgos descriptos previamente.

La dosis de CBD demostró ser segura, en un rango bastante amplio entre 0,5 y 30 mg/kg/día, aunque algunos pacientes debieron recibir dosis de 50 mg/kg/día. Con respecto a las formulaciones basadas en mezclas de CBD y THC, la concentración de este último no superó el 1%.

Los EA descriptos con mayor frecuencia ($>10\%$) fueron somnolencia, disminución del apetito, fatiga, diarrea, convulsiones, cambio del apetito, letargia, alteraciones en la marcha, sedación e irritabilidad. Los EA fueron más frecuentemente informados durante los primeros 14 días de titulación de la dosis. La mayoría de los eventos reportados fueron leves o moderados y transitorios.

Los pacientes incluidos en la mayor parte de los estudios evaluados fueron pacientes graves, con epilepsia refractaria, en tratamiento con por lo menos tres fármacos antiepilépticos y otras opciones terapéuticas como la cirugía para epilepsia, la dieta cetogénica o la estimulación vagal, sin lograr un control adecuado de las crisis. En Devinsky et al (2017) casi todos los pacientes tenían un retraso madurativo moderado y severo.

En todos los estudios se plantea el uso de los cannabinoides como un tratamiento coadyuvante y sinérgico con el tratamiento de base, lo que permite en la mayoría de los casos suprimir algún fármaco o reducir su dosis, con el consecuente beneficio. Nunca se ha considerado el uso de cannabis como único medicamento ni como primera opción terapéutica. Con respecto a la calidad metodológica, el único ensayo clínico controlado fue Devinsky et al (2017) que incluyó únicamente pacientes con Síndrome Dravet, mientras que el resto de los estudios incluidos en la tabla son estudios descriptivos que carecen de grupo control y son de baja calidad metodológica. Los estudios descriptivos incluyeron pacientes con crisis tónicas, atónicas, clónicas o tónico-clónicas, Síndrome Dravet, Lennox-Gastaut y Doose entre otros.

Si bien existe escasa evidencia y de baja calidad, desde el comienzo del uso de cannabinoides en epilepsia, en los últimos tres años se ha demostrado el efecto anticonvulsivo del CBD en pacientes con SD y un efecto francamente beneficioso en el resto de las epilepsias refractarias al tratamiento en niños y jóvenes, con un rango de seguridad muy razonable.

Las principales limitaciones de estos estudios son el financiamiento por parte de la industria (GW) lo cual ha sido declarado en los estudios de Devinsky et al 2016 y 2017.

La relativa facilidad en la obtención del aceite artesanal, en ningún caso debe hacer suponer que su elaboración sin control pueda asegurar la provisión adecuada del principio activo CBD a la población. Los riesgos incluyen: la imposibilidad técnica de asegurar manufactura apropiada, composición precisa y dosis entregada, tipo de cultivo adecuado y previsible de la planta, ausencia de contaminantes y otras tantas variables aleatorias, que atentan contra cualquier intento terapéutico que pueda considerarse eficaz y seguro.

6. CONCLUSIONES

El uso de CBD en formulaciones estandarizadas y controladas (obviamente, esto excluye a las preparaciones caseras), en una concentración del 99% y nunca menor al 96% con respecto al THC, como tratamiento adyuvante en la epilepsia refractaria o fármacorresistente en niños y jóvenes, ha demostrado tener efecto anticonvulsivante principalmente en crisis motoras y debe considerarse como una opción efectiva y segura en el tratamiento de este tipo de pacientes.

Más allá de su probada eficacia anticonvulsivante, permite en la mayoría de los casos reducir la dosis de otros fármacos anticonvulsivantes y sus efectos adversos, lo que resulta en mejoría de la calidad de vida de los pacientes y de sus cuidadores.

El uso medicinal de los cannabinoides y sus compuestos no adictivos deben ser considerados dentro del arsenal terapéutico de uso controlado, en el tratamiento de la epilepsia refractaria.

RECOMENDACIÓN

FUERTE: a favor del uso de CBD en el síndrome de Dravet, resistente al tratamiento anticonvulsivo (Formulación: manufactura con garantía de calidad, 99% CBD/1% THC).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no han declarado ningún conflicto de intereses real o potencial para la elaboración del presente documento y han respondido negativamente a todos y cada uno de los siguientes puntos:

- a. En los últimos 5 años, he recibido financiamiento desde o he prestado de servicios a alguna institución que pueda beneficiarse o perjudicarse con los resultados de este informe técnico (reembolso por conferencias, presentaciones, clases, consultoría, financiamiento de investigaciones);
- b. Estoy en posesión de acciones de alguna institución que pueda beneficiarse o perjudicarse con los resultados de este informe técnico;
- c. Actué o actué como perito judicial en alguna causa relacionada con los resultados de este informe técnico;
- d. Tengo alguna convicción personal relacionada al tema de este informe técnico que podría influenciar los resultados;
- e. Participo en algún grupo de interés que pueda influenciar los resultados de este informe técnico;
- f. Tengo sentimientos de antipatía, rivalidad o amigables en relación a alguna persona cuyos intereses podrían verse afectados por los resultados de este informe técnico;

7. BIBLIOGRAFÍA

- Benbadis S, Sanchez-Ramos J, Bozorg A, et al. Medical marijuana in neurology. *Expert Rev. Neurother.* 2014. 14 (12); 1453–65.
- Detyniecki K y Hirsch L. Marijuana Use in Epilepsy: The Myth and the Reality. *CurrNeuroSci Rep.* 2015; 15:65.
- Guía básica sobre los Cannabinoides. Sociedad española de investigación sobrecannabinoides. Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid.
- Martínez Orgado JA, Fernández López D, Bonet Serra B, et al. El sistema cannabinoide y su importancia en el período perinatal. *AnPediatr.* 2005; 63 (5):433-40.
- Youssef FF, Irving AJ. From Cannabis to the Endocannabinoid System: Refocussing Attention on Potential Clinical Benefits. *West IndianMed J.* 2011; 60 (3):264.
- Reddy D y Golub V. The Pharmacological Basis of Cannabis Therapy for Epilepsy. *JPharmacolExpTher.* 2016; 357:45–55.
- Yacubian EM, Contreras-Cacedo G y Rios-Pohl L. Tratamiento farmacológico de las epilepsias. Academia Latinoamericana de Epilepsia. 2014.
- Cilio M, Thiele E, Devinsky O. The case for assessing cannabidiol in epilepsy. *Epilepsia.* 2014; 55 (6):787–790.
- Rosenberg E, Tsien R, Whalley B, et al. Cannabinoids and Epilepsy. *Neurotherapeutics.* 2015; 12:747–68.
- Nota descriptiva. Organización Mundial de la Salud. 2017.
- Informe sobre la epilepsia en latinoamerica. Organización Panamericana de la Salud. 2008.
- Sottano ME, Aberastury M, Silva W, et al. Pronóstico posthemisferotomía en epilepsia refractaria de niños y adultos. *Neurologia Argentina.* 2016
- Portal de información de enfermedades raras y medicamentos huérfanos.
- Kogan N y Mechoulam R. *Cannabinoids in health and disease. Dialogues in Clinical Neuroscience.* 2007; 9 (4).
- Bagshaw S. *Medical efficacy of cannabinoids and marijuana: a comprehensive review of the literature. Journal of Palliative Care.* 2002. 18, 2.
- Devinsky O, Cross H, Laux L, et al. *Trial of Cannabidiol for Drug-resistant seizures in the Dravet Syndrome. N Engl J Med.* 2017; 376 (21): 2011-20.
- Devinsky O, Marsh E, Friedman D, et al. *Cannabidiol in patients with treatment-resistant epilepsy: an open-label interventional trial. LancetNeurol.* 2016; 15 (3):270-8.
- Tzadok M, Uliel-Siboni S, Linder I, et al. *CBD-enriched medical cannabis for intractable pediatric epilepsy. The current Israeli experience. Seizure.* 2016 (35):41–44.
- Yap M, Easterbrook L, Connors J, et al. *Use of cannabis in severe childhood epilepsy and child protection considerations. Journal of Paediatrics and Child Health.* 2015; 51:491–6.
- Gloss D, Vickrey B. *Cannabinoids for Epilepsy. Cochrane database of systematic review.* 2014. 3; 1-23.
- Koppel B, Brust J, Fife T, et al. *Systematic review: Efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders. Report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. American Academy of Neurology.* 2014. 82: 1556-63.
- Ames F, Cridland S. *Anticonvulsant effect of cannabidiol. South African Medical Journal.* 1986. 69:14.
- Carlini E, Cunha J. *Hypnotic and Antiepileptic Effects of Cannabidiol. The Journal of Clinical Pharmacology.* 1981. 21(1): 417-27.
- Cunha J, Carlini E., Pereira A., et al. *Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. Pharmacology* 1980. 21: 175-85.
- Mechoulam R, Carlini E. *Toward drugs derived from Cannabis. Naturwissenschaften.* 1978. 65: 174-9.
- *National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. The health effects of cannabis and cannabinoids: The current state of evidence and recommendations for research. The National Academies Press.* 2017.
- Soto N, Pichon-Riviere A, Augustovski F, et al. Cannabinoides para el tratamiento de la epilepsia refractaria. Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria. Noviembre 2016. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov>
- Press C, Knupp K y Chapman K. *Parental reporting of response to oral cannabis extracts for treatment of refractory epilepsy. EpilepsyBehav.* 2015; 45:49-52.
- Hussain S, Zhou R, Jacobson C, et al. *Perceived efficacy of cannabidiol-enriched cannabis extracts for treatment of pediatric epilepsy: A potential role for infantile spasms and Lennox-Gastaut syndrome. EpilepsyBehav.* 2015; 47:138-41.
- Mathern G, Beninsig L and Nehlig A. *Fewer specialists support use of medical marijuana and CBD in treating epilepsy patients compared with other medical professionals and patients: Result of Epilepsy's survey. Epilepsia.* 2015; 56(1):1–6.
- Porter B and Jacobson C. *Report of a parent survey of cannabidiol-enriched cannabis use in pediatric treatment-resistant epilepsy. EpilepsyBehav.* 2013; 29(3):574–77.
- Consroe PF, Wood GC, Buchsbaum H. *Anticonvulsant nature of marijuana smoking. JAMA.* 1975 Oct 20; 234(3):306-7.
- Lorenz R. *On the application of cannabis in paediatrics and epileptology. NeuroendocrinolLett* 2004; 25 (1/2):4–44.
- Mortati K, Dworetzky B, Devinsky O. *Marijuana: an effective antiepileptic treatment in partial epilepsy? A case report and review of the literature. RevNeuroDis.* 2007; 4(2):103-6.
- Ladino LD, Hernández-Ronquillo L, Téllez-Zenteno JF. *Medicinal Marijuana for Epilepsy: A Case Series Study. Can J NeurolSci.* 2014; 41: 1-6.
- Saade D, Joshi C. *Pure Cannabidiol in the Treatment of Malignant Migrating Partial Seizures in Infancy: A Case Report. PediatrNeurol* 2015; 52: 544-7.
- Rosemergy I, Adler J, Psirides A. *Cannabidiol oil in the treatment of super refractory status epilepticus. A case report. Seizure.* 2016; 35: 56–8.
- Geoffrey AL, Pollack SF, Bruno PL, and Thiele EA. *Drug-drug interaction between clobazam and cannabidiol in children with refractory epilepsy. Epilepsia.* 2015; 56(8):1246–51.

REGISTRO DE ESTABLECIMIENTOS Y DE ESPECIALIDADES MEDICINALES DURANTE EL PRIMER SEMESTRE 2017

Margarita Melgarejo, Roberto Sierras.
 Dirección de Gestión de Información Técnica (DGIT).
 Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica.

INTRODUCCIÓN

El Decreto N° 1271/13 aprueba la nueva estructura organizativa de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) y crea la Dirección de Gestión de Información Técnica. Entre las funciones de esta nueva Dirección se destaca la tarea de mantener actualizados los sistemas registrales de la Administración Nacional en lo referente a: Registro de Especialidades Medicinales (REM), el Registro Nacional de Productores y Productos de Tecnología Médica (RPPTM) y el Registro de Establecimientos, entre otros.

Se realizan periódicamente informes de gestión, analizando procesos integrales que permiten la toma de decisiones amparados en el paradigma de la ciencia regulatoria.

Para la realización de este trabajo se tomaron los datos registrales del primer semestre del año en curso, en lo referente a la inscripción de establecimientos y de especialidades medicinales.

REGISTRO DE ESTABLECIMIENTOS

En cuanto a la inscripción de establecimientos se gestionaron un total de 418 habilitaciones, de las cuales un grupo corresponde a nuevas habilitaciones, el otro grupo a autorizaciones de modificaciones en su estructura edilicia y, por último, a bajas de habilitaciones de establecimientos tanto las de oficio como a pedido del titular (Figura 1).

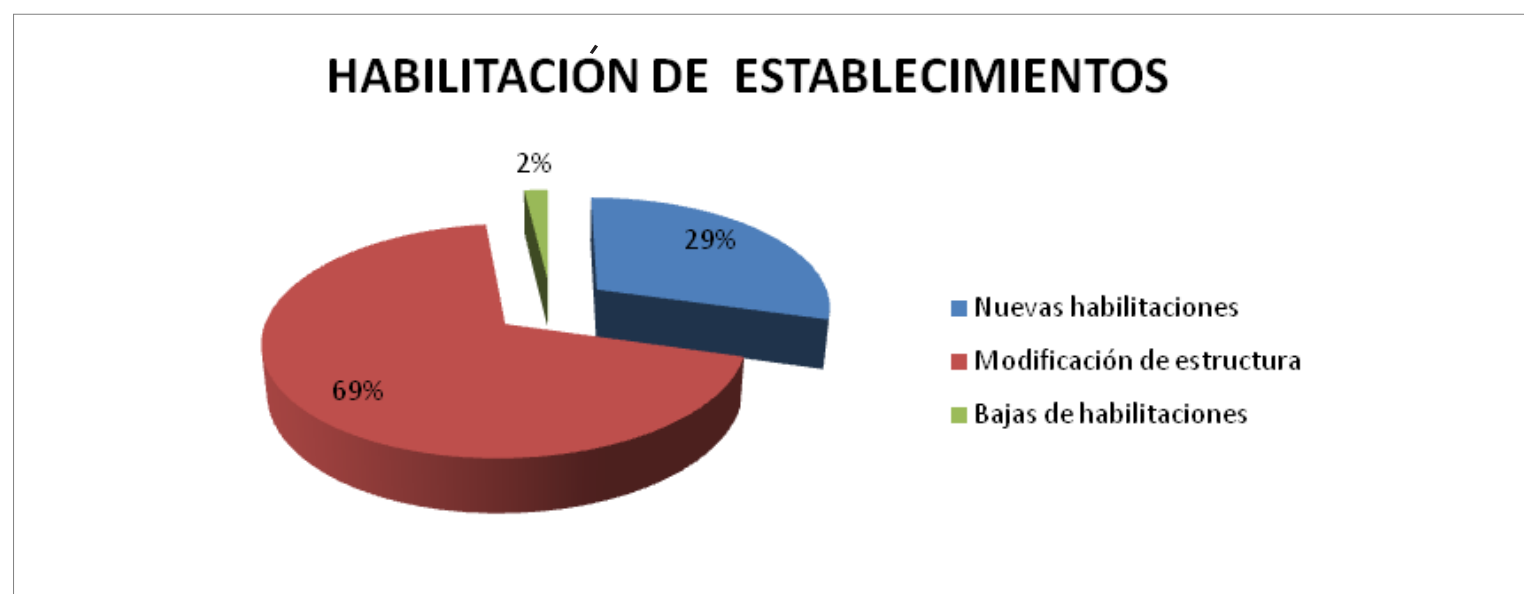


Figura 1. Habilitación, modificación y baja de establecimientos.

Nuevas habilitaciones de establecimientos

Este grupo fue categorizado en los siguientes rubros: especialidades medicinales, productos de higiene personal, cosméticos y perfumes, producto médico y tránsito interjurisdiccional de medicamentos y productos médicos (Figura 2).

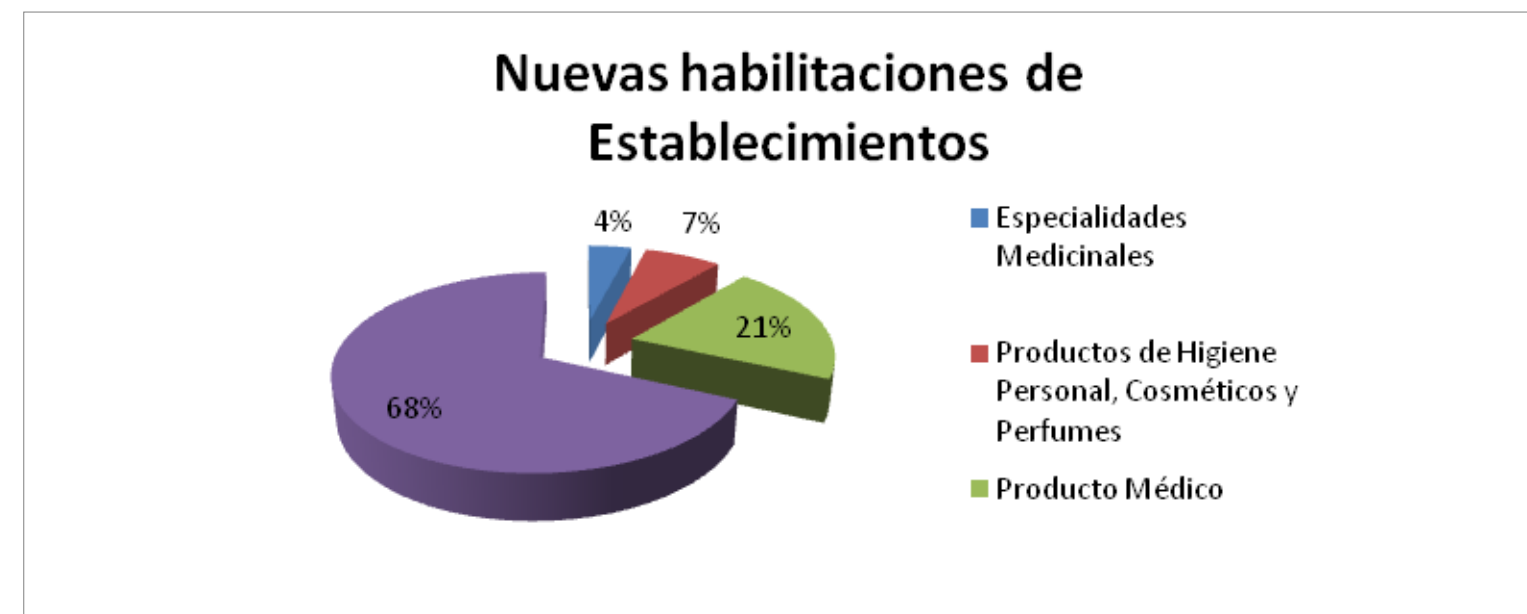


Figura 2. Nuevas habilitaciones de establecimientos categorizadas por rubros.

Modificaciones en la estructura edilicia

Este grupo fue categorizado en los siguientes rubros: especialidades medicinales, productos de higiene personal, cosméticos y perfumes, producto médico y tránsito interjurisdiccional de medicamentos y productos médicos. (Figura 3).

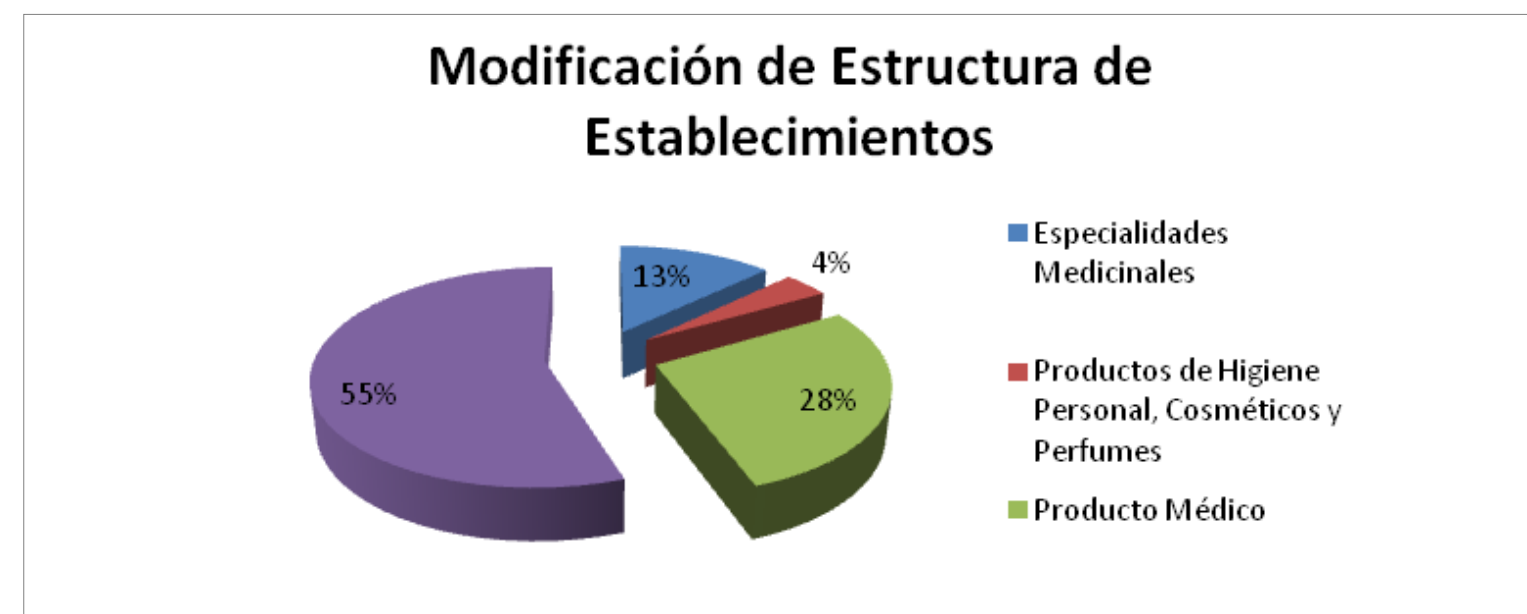


Figura 3. Modificación de la estructura de establecimientos categorizada por rubros.

REGISTRO DE ESPECIALIDADES MEDICINALES (REM)

Categorización por Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs)

Durante el primer semestre del año en curso se inscribieron en el REM un total de 151 certificados. Se categorizaron terapéuticamente los IFAs, según la clasificación ATC 2017(Figura 4).

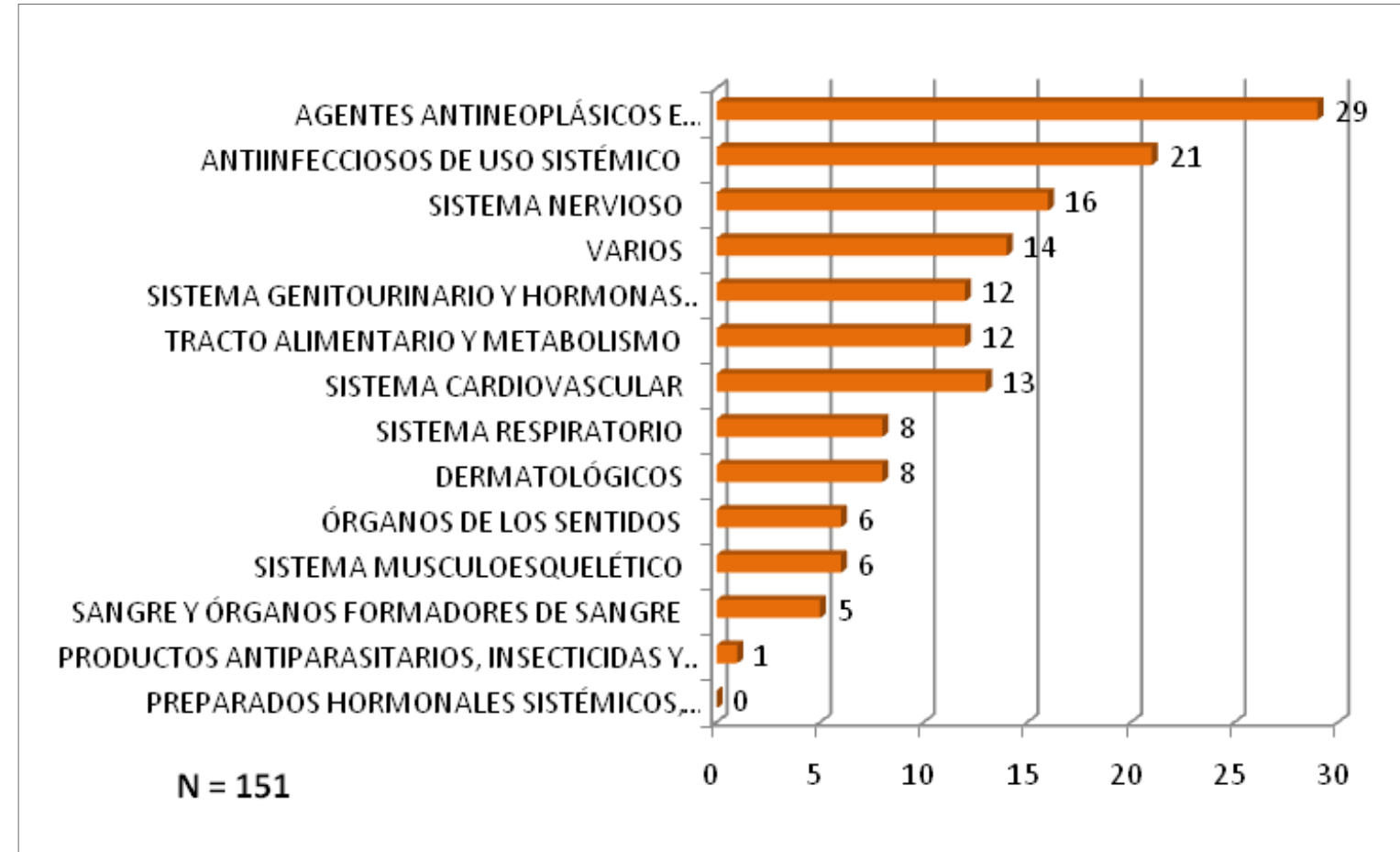


Figura 4. IFAs en el REM según clasificación ATC 2017. Expresados en cantidad de especialidades medicinales inscriptas.

Altas de comercialización en el vademécum nacional de medicamentos

La especialidad medicinal, luego de su inscripción en el REM, para ser comercializada debe tener aprobada la verificación técnica del primer lote. Posteriormente, el titular del registro solicita, mediante declaración jurada, el alta en VNM, previa verificación de la documentación correspondiente.

Se categorizaron terapéuticamente, según clasificación ATC 2017, aquellos IFAs que pasan al estado de comercializados (Figura 5).

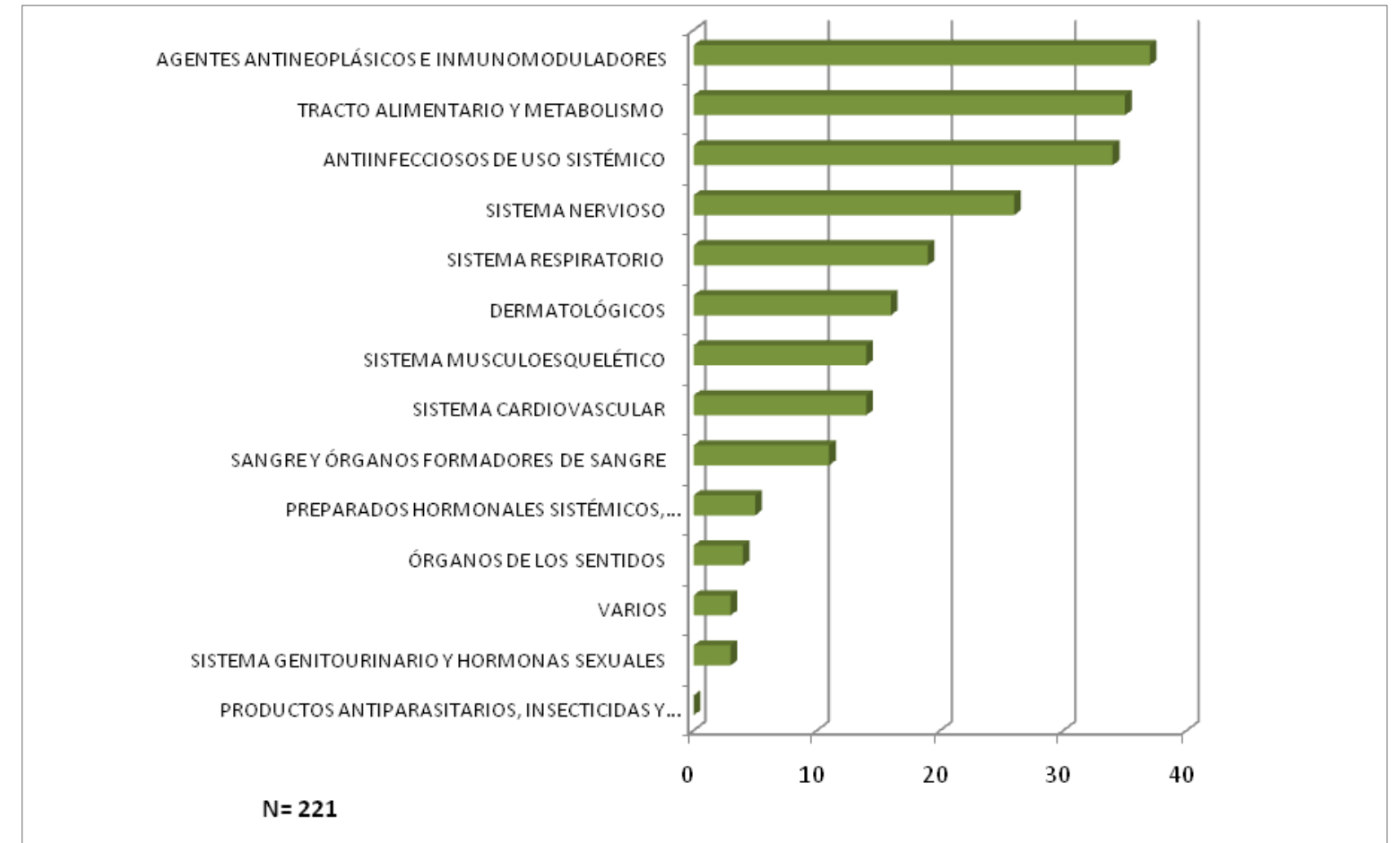


Figura 5. Altas de comercialización en VNM. IFAs categorizados por clasificación ATC 2017. Expresada en cantidad de especialidades medicinales

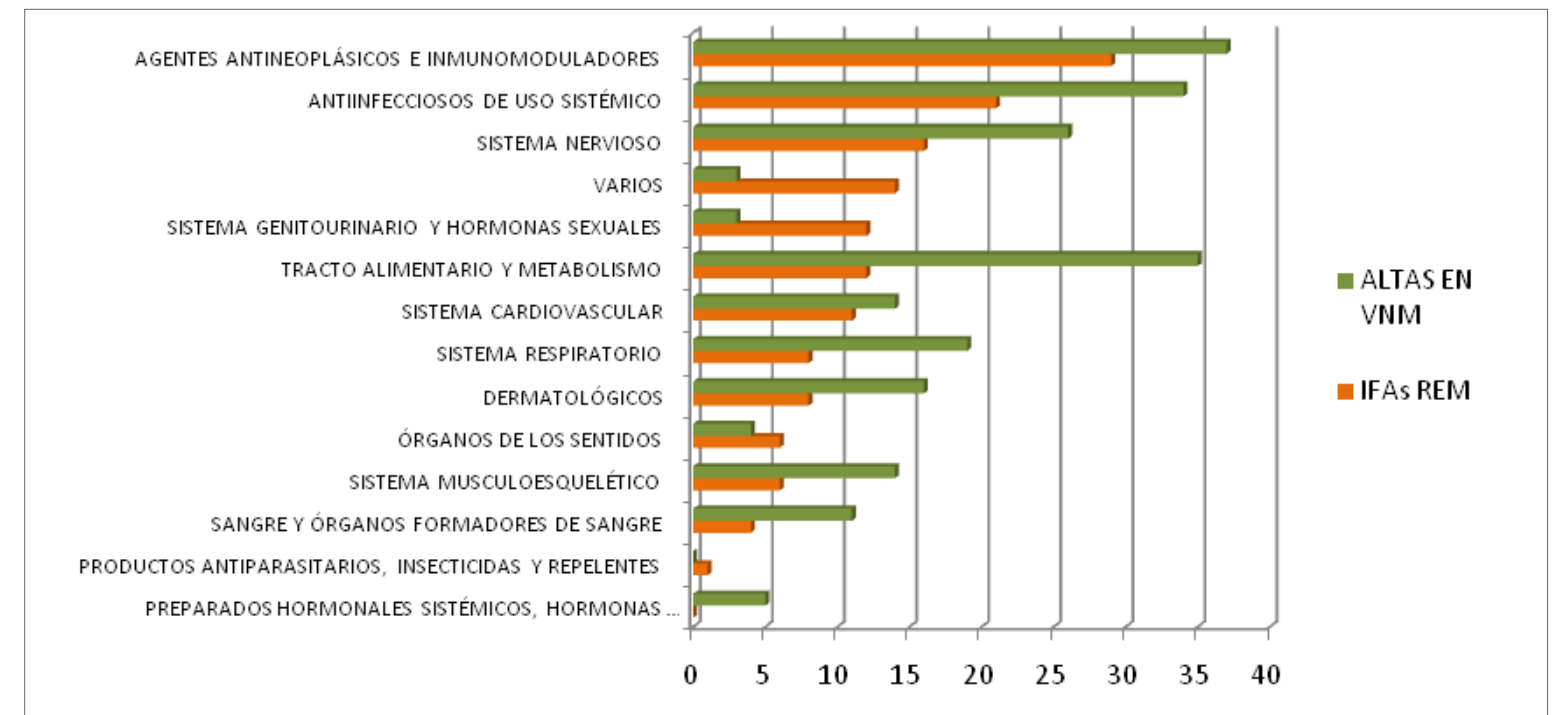


Figura 6. IFAs en el REM según clasificación ATC 2017. Altas de comercialización, IFAs categorizados por clasificación ATC 2017.

Se cruzan ambos gráficos comparando los diferentes grupos terapéuticos más registrados y más comercializados. Durante el año en curso, en su primer semestre, se puede apreciar las tendencias en los diferentes grupos farmacológicos, en lo que respecta a la inscripción en el REM comparando con las altas de comercialización. Se observa que el grupo de AGENTES ANTINEOPLÁSICOS E INMUNOMODULADORES lideran ambos rankings. Es decir, se inscriben y se comercializan con mayor proporción en relación a los otros grupos terapéuticos. Sin embargo, el grupo de los productos ANTIINFECCIOSOS DE USO SISTÉMICO se inscriben en el segundo lugar, pero se comercializa en el tercer lugar. En cuanto al grupo TRACTO ALIMENTARIO Y METABOLISMO se comercializa en segundo lugar, pero se inscriben en sexto lugar. Se podría inferir que se encuentran inscriptos desde hace tiempo, pero se le otorga el alta de comercialización en el mercado en mayor cantidad cuando se lo compara con su inscripción (Figura 6).

Categorización por origen y fuente de obtención del IFA

El conjunto de IFAs inscriptos en el REM, se categorizaron por el dato identificatorio característico que figura en el certificado de inscripción como origen y fuente de obtención. El grupo con mayor inscripción en el REM, corresponde a los IFAs de origen sintético/semisintético (Figura 7).

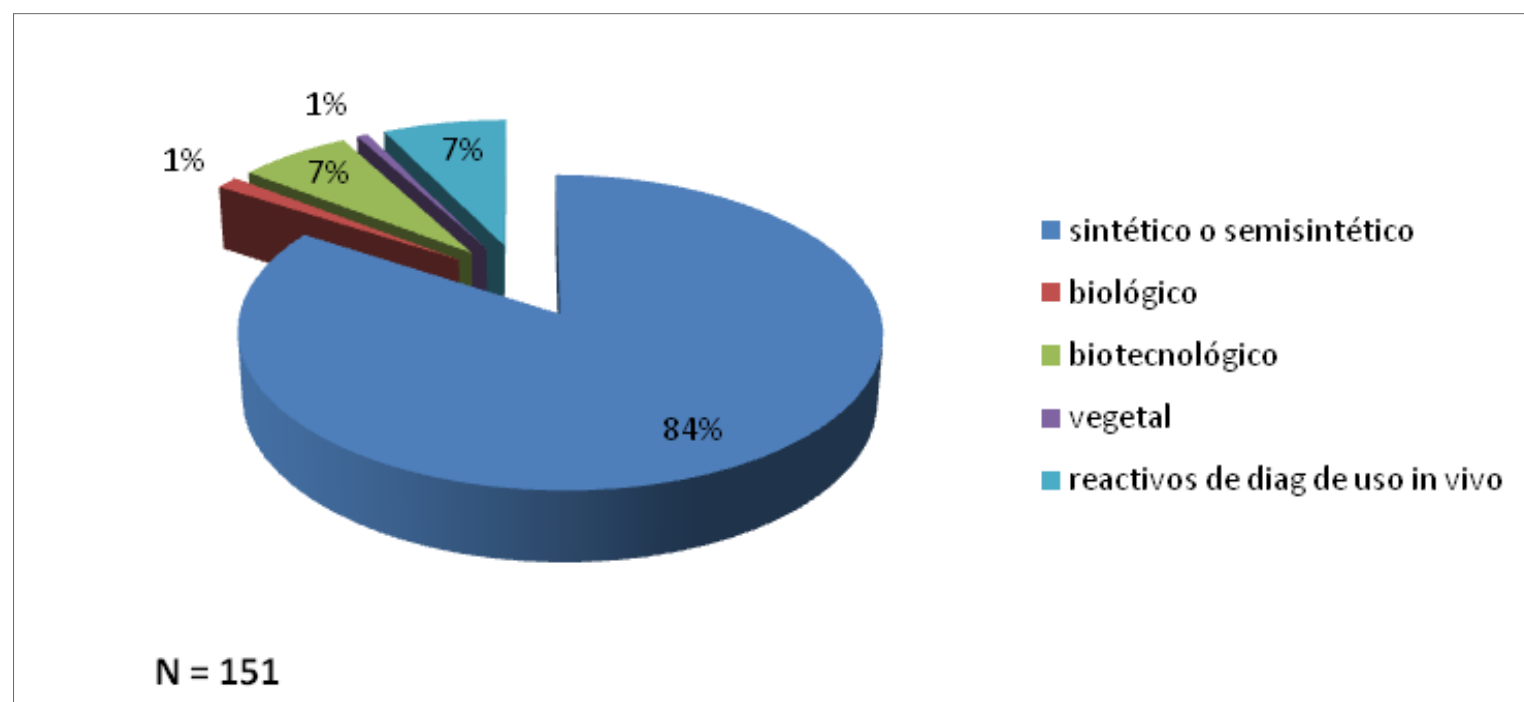


Figura 7. Categorización por origen y fuente de obtención del IFA. Expresado en cantidad de certificados

Categorización de especialidades medicinales según encuadre legal

El encuadre legal establecido por el Decreto N° 150/92 (t.o. 1993) en sus artículos 3°, 4 y 5° que respectivamente corresponden a especialidades medicinales de elaboración nacional, importadas y novedades terapéuticas.

Existen afecciones con muy baja prevalencia pero con serias consecuencias para el paciente y su entorno familiar conocidas como enfermedades poco frecuentes. En el plano internacional a los medicamentos destinados a este tipo de enfermedades se los denomina "medicamentos huérfanos" o "drogas huérfanas". Este tipo de especialidades medicinales se registran "bajo condiciones especiales". El certificado de inscripción otorgado tiene una vigencia de entre seis meses y dos años. Son más conocidas como Registros Especiales de los cuales se consignaron solo especialidades medicinales importadas. (Figura 8)

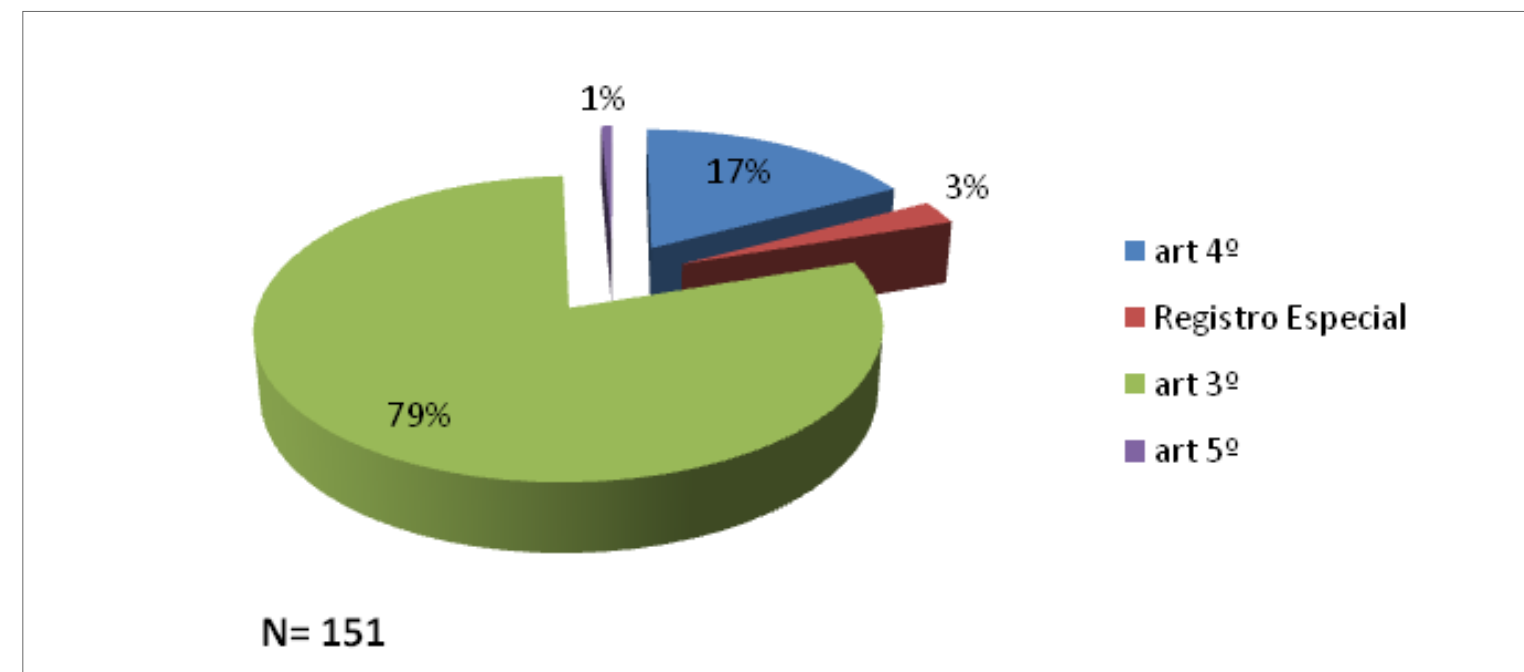


Figura 8. Categorización de especialidades medicinales según encuadre legal. Expresado en cantidad de certificados inscriptos

Especialidades medicinales importadas

Se observa que las mayores frecuencias de especialidades medicinales importadas proceden de Alemania en primer lugar, EEUU en segundo lugar y España en tercer lugar, siguiendo Canadá e Irlanda en cuarto y quinto lugar (Figura 9).

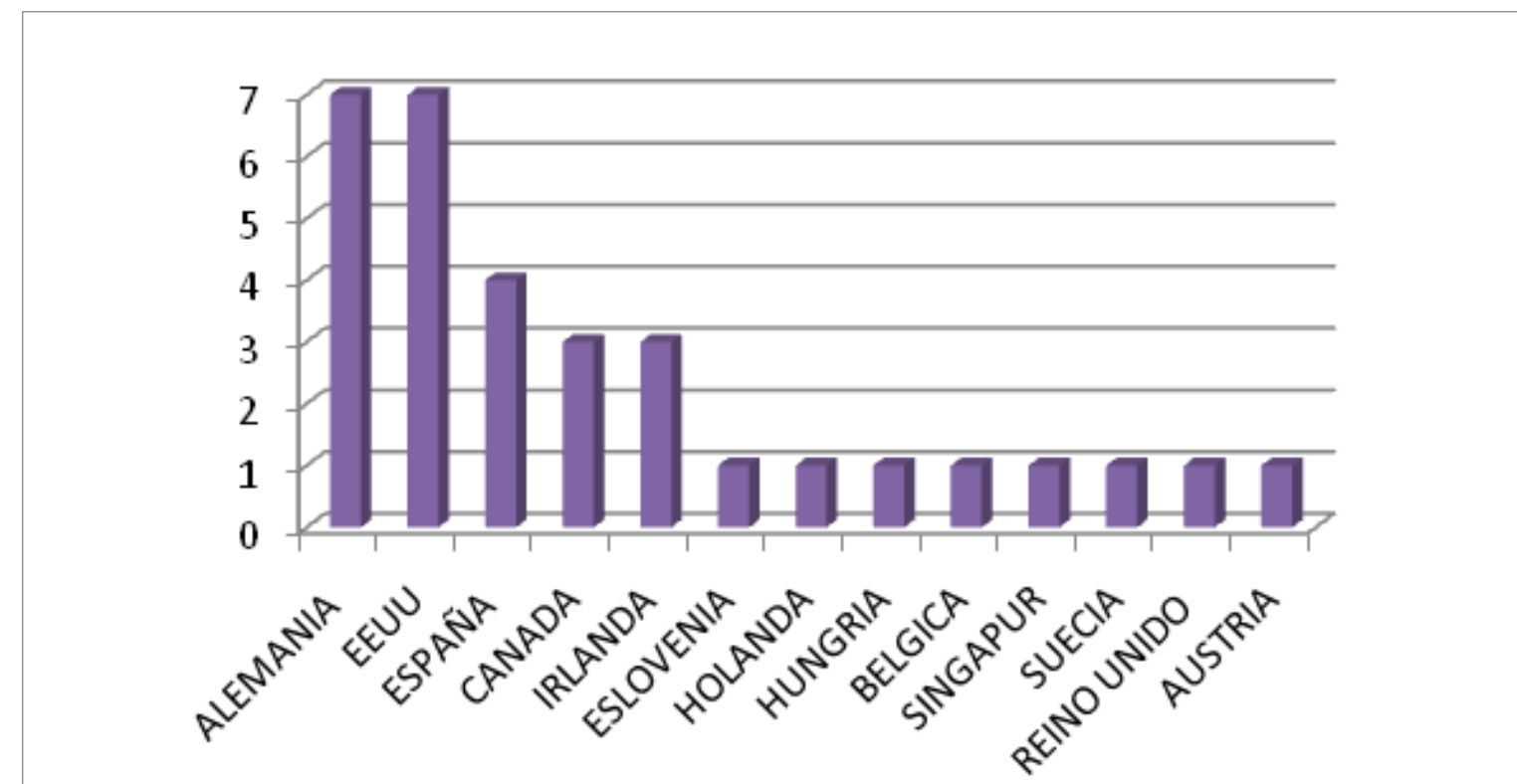


Figura 9. Especialidades medicinales importadas por país de origen de importación. Expresado en cantidad de certificados inscriptos

Categorización según condición de expendio

El mayor porcentaje corresponde a la condición de venta bajo receta y en segundo lugar venta bajo receta archivada. El REM contiene los reactivos de diagnóstico de uso in vivo como, por ejemplo, los preparados radiofarmacéuticos para uso terapéutico o diagnóstico. No son de venta al público, sino que se los autoriza para su dispensación en unidades de medicina nuclear. Es por esta razón que se los incluye, aunque no estén contenidos en las condiciones de expendio que especifica la Ley N° 16.463 (Figura 10).

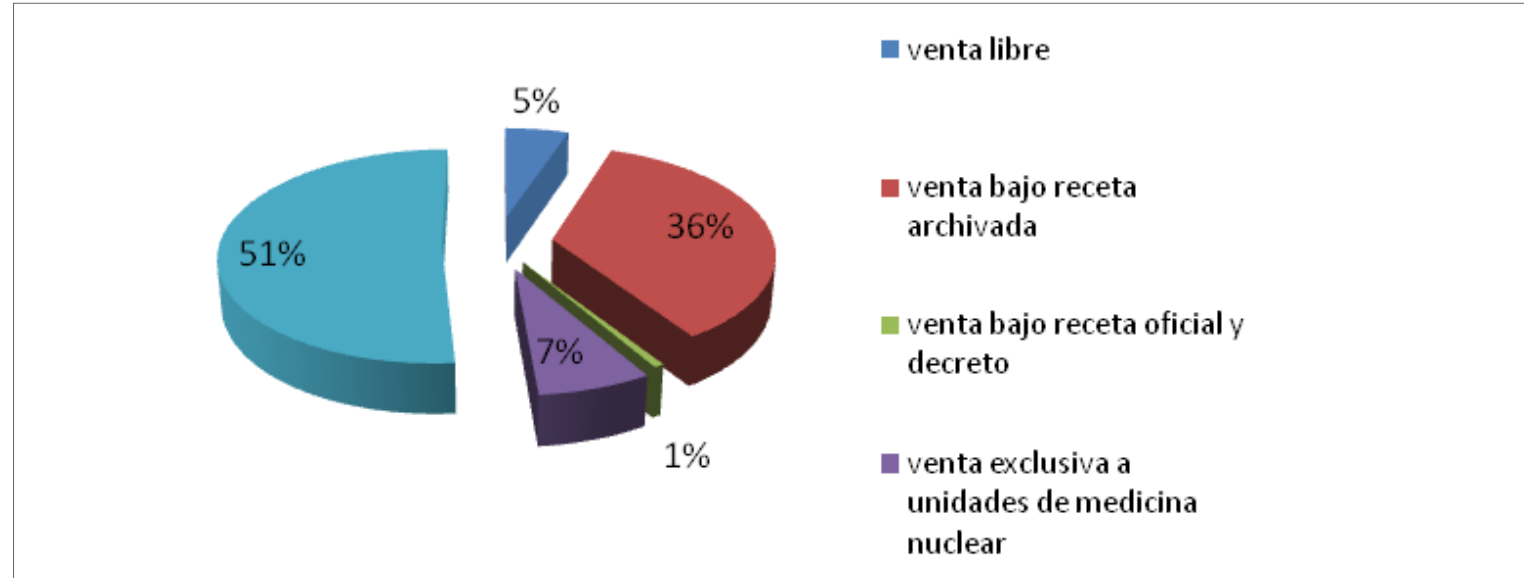


Figura 10. Categorización de especialidades medicinales según condición de expendio. Expresado en cantidad de certificados inscriptos.

Cancelaciones de Certificados inscriptos en el REM

De un total de 483 cancelaciones de certificados inscriptos en el REM se diferencian las cancelaciones de oficio de aquellas que fueron a solicitud del titular del registro (Figura 11).

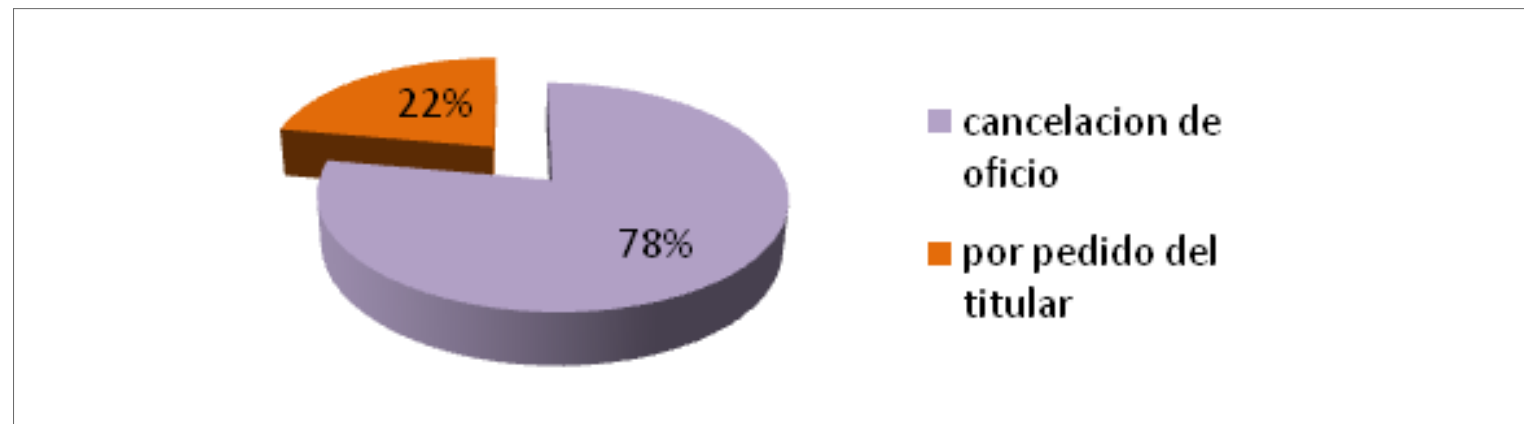


Figura 11. Cancelaciones de Certificados

Autorización de certificados en el REM

Este gráfico corresponde a la cantidad de autorizaciones de certificados inscriptos en el Registro por mes de este primer semestre del corriente año. Se inscribieron un total de 151 certificados (Figura 12).

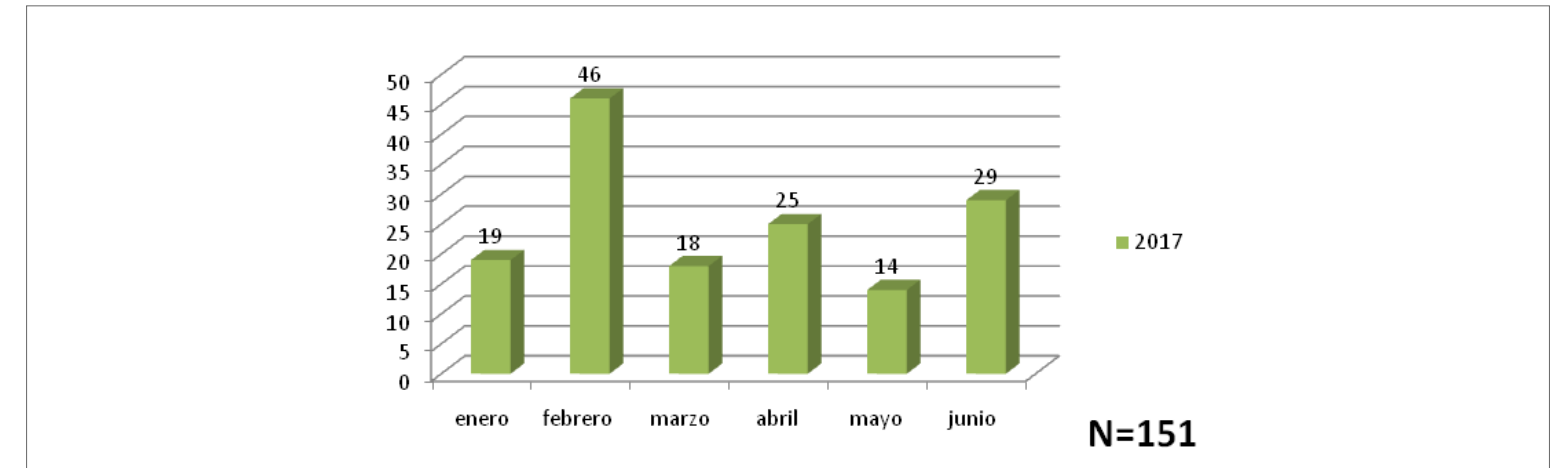


Figura 12. Evolución mensual de autorizaciones de certificados en el REM

Comparación del primer semestre del año 2016 versus el primer semestre del año 2017

Se compara la cantidad de autorizaciones de certificados inscriptos en el Registro en cada mes de este primer semestre del corriente año contra las registradas en el primer semestre del año 2016. (Figura 13)

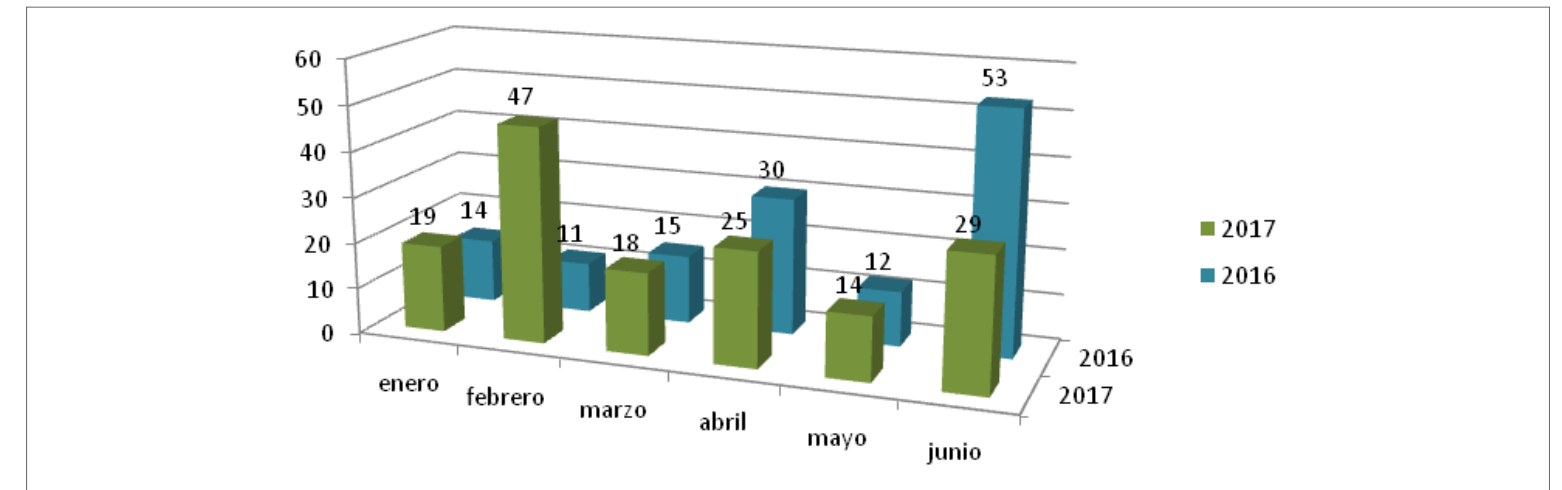


Figura 13. Comparativa de la evolución mensual de autorizaciones de certificados de especialidades medicinales entre primer semestre de 2016 vs primer semestre 2017.

CONCLUSIONES

A través de este trabajo podemos visualizar la gestión de procesos transversales en lo referente a la inscripción de nuevos establecimientos y modificaciones de sus estructuras; como así también los movimientos en el Registro de Especialidades Medicinales. Con respecto a las bajas de establecimientos y cancelaciones de certificados, tanto de oficio como a pedido de su titular, permite mantener el control sistemático en los sistemas registrales del Organismo. Es importante destacar el análisis efectuado a las especialidades medi-

cionales inscriptas en el REM como así también aquellas que pasaron a la condición de comercializadas, cuyos IFAs se categorizaron por grupo terapéutico según la Clasificación ATC 2017. Como consecuencia de procesar esta información sabemos cuál es el grupo terapéutico con mayor inscripción y el que mayor incidencia tuvo en el cambio de estado de comercialización. Como así también una comparación mes a mes del mismo semestre del año 2016 versus el año 2017.

Fuentes:

Registros de Establecimientos, REM, VNM e Informes de Gestión de la DGIT.

CONTROL DEL MERCADO ARGENTINO DE ESPECIALIDADES MEDICINALES QUE CONTIENEN ORLISTAT

María P. Álvarez, Alejandra Genoud, Eduardo E. Saint Martin, Matías E. Gomez, Marta E. Spinetto.
Servicio de Desarrollo y Validación, Departamento de Química y Física, Instituto Nacional de Medicamentos, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.
Contacto: mpalvarez@anmat.gov.ar

INTRODUCCIÓN

Orlistat es un principio activo diseñado para el tratamiento de la obesidad. Previene la absorción de grasas ingeridas en la dieta y de ese modo se reduce la ingesta calórica. El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la lipasa pancreática, enzima que hidroliza triglicéridos en ácidos grasos absorbibles en el intestino y, en consecuencia, se excretan sin digerir.

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo el control de mercado de las especialidades medicinales autorizadas en el territorio nacional que contienen Orlistat como principio activo, en cápsulas o comprimidos. La monografía se encuentra codificada en Farmacopea de Estados Unidos, edición 38 (USP38) para materia prima y producto terminado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos farmacéuticos, reactivos químicos materias primas y estándares de referencia: Acetonitrilo grado HPLC TEDIA, agua calidad MilliQ, ácido fosfórico 85% PA Sintorgan, Orlistat materia prima, Orlistat USP (Lote GOL008) estándar de referencia, Orlistat Compuesto Relacionado D (Lote GOL 570), excipientes: celulosa microcristalina, dióxido de silicio coloidal, estearil fumarato de sodio, carboximetil almidón, lauril sulfato de sodio, lactosa, almidón de maíz pregelatinizado, maltosa, estearato de magnesio, croscaramelosa sódica, polisacárido de soja, caolín coloidal.

Instrumental: Se utilizó un cromatógrafo con detector de arreglo de diodos Shimadzu Serie 10, balanzas analíticas Ohaus Analytical Plus, sonicador Testlab TBO4TA, un agitador mecánico IKA KS 260.

Control de mercado: Se analizaron siete productos que corresponden a seis laboratorios (nombrados con letras de la A a la F): laboratorios A y B Orlistat 60 y 120 mg/cápsula, laboratorios C y D Orlistat 120 mg/cápsula, laboratorio E Orlistat 60 mg/cápsula y el laboratorio F Orlistat 120 mg/comprimido.

Método analítico: Se utilizó la monografía codificada en USP38. La identificación del principio activo se realizó según el ensayo de

valoración. Dicho ensayo se realizó mediante una elución isocrática con una mezcla de acetonitrilo: ácido fosfórico: agua (860:0.05:140), una columna de octadecilsilano (*Phenomenex C18(2)*) 150 mm de largo x 3.9 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula; flujo 1,0 ml/min; longitud de onda de detección 195 nm; volumen de inyección 20 µl y temperatura 30°C. Las concentraciones de trabajo para estándar y muestra fueron 0.6 mg/mL en fase móvil.

Para la cuantificación de las impurezas Orlistat *open-ring* epimer, Orlistat *open ring*, Orlistat compuesto relacionado D, Hexil undecil piranona, Henicosenil leucinato y otras impurezas identificadas o no identificadas, se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas que en el ensayo de valoración y una solución de adecuación que contenía 5×10^{-4} mg/mL del compuesto relacionado D y 0.6 mg/mL de Orlistat estándar de referencia en fase móvil. La resolución entre ambos compuestos debe ser no menor a 1,4.

Se llevó a cabo el método de uniformidad de unidades de dosificación según lineamientos de la USP39.

Verificación del método analítico: Para evaluar la especificidad frente a placebo se realizaron muestras sintéticas con los excipientes de cada una de las fórmulas sin el principio activo. Se evaluó la ausencia de picos en el tiempo de retención que corresponde al tiempo de retención del Orlistat.

Para determinar la exactitud se prepararon muestras sintéticas en los siguientes niveles: 70, 100 y 120%. Se analizaron por triplicado a partir de tres pesadas independientes. Se determinó la cantidad recuperada del principio activo en las dos formas farmacéuticas.

RESULTADOS

Verificación del método analítico: El método permite una adecuada resolución de los picos de Compuesto relacionado D y Orlistat estándar de referencia.

No se observaron picos en el cromatograma del placebo que pudieran interferir con la identificación y/o valoración del pico de Orlistat ni con la cuantificación de impurezas.

Los resultados del ensayo de exactitud para cápsulas fueron: Nivel 70%: 99,7% con un RSD%: 0,4; Nivel 100%: 100,2 con un RSD%: 0,1; Nivel 120%: 98,6% con un RSD%: 0,5.

Los resultados del ensayo de exactitud para los comprimidos fueron: Nivel 70%: 100,7% con un RSD%: 0,1; Nivel 100%: 100,7 con un RSD%: 0,4; Nivel 120%: 100,3% con un RSD%: 0,4.

Control de mercado: El ensayo de identificación para todas las especialidades medicinales analizadas resultó positivo para Orlistat. En las Tablas 1 y 2 se observan los resultados de los ensayos de valoración, uniformidad de unidades de dosificación e impurezas.

Tabla 1: Valoración como porcentaje respecto al valor declarado (Especificación: 90.0 – 110.0) y uniformidad de unidades de dosificación (Especificación L_1 :15.0).

Laboratorio	A		B		C	D	E	F
Dosis (mg)	60	120	60	120	120	120	60	120
Valoración	94.6	101.2	97.1	97.1	94.9	97.0	100.7	102.2
Uniformidad de unidades de dosificación	L_1 : 9.0	L_1 : 4.9	L_1 : 4.7	L_1 : 8.4	L_1 : 10.3	L_1 : 6.6	L_1 : 6.6	L_1 : 9.9

Tabla 2: Cuantificación de impurezas (ND: No detectable)

	A		B		C	D	E	F
Orlistat <i>open ring</i> epimer \leq 1.5%	ND	ND	ND	ND	ND	0.3	ND	0.6
Orlistat Comp D \leq 1.0%	ND	ND	<0.1	0.1	ND	ND	<0.1	0.3
Otras impurezas identificadas \leq 0.3%	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3

CONCLUSIONES

Todos los productos analizados demostraron su calidad al cumplir con las especificaciones de los ensayos de Identificación, Valoración y Sustancias Relacionadas establecidas en USP38. Los métodos de control resultaron ser simples, específicos, exactos, precisos y de muy fácil implementación, permitiendo una rápida identificación y valoración del principio activo Orlistat para cápsulas y comprimidos, así como una correcta cuantificación de impurezas.

Este trabajo se enmarca dentro de la misión fundamental de la ANMAT

de evaluar la seguridad, calidad y eficacia de los productos para la salud. Es dentro de este marco donde interviene el Laboratorio Nacional de Control al determinar la calidad de las especialidades medicinales del mercado nacional con el objetivo de garantizar medicamentos seguros, eficaces y de calidad.

BIBLIOGRAFÍA

- *United States Pharmacopeia, Edition 38, Monograph: Orlistat. Orlistat capsules*; 2015.

OPTIMIZACIÓN DEL ANÁLISIS DE MUESTRAS MEDIANTE INCORPORACIÓN DE LA TÉCNICA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE ULTRARRÁPIDA

Marcela I. García*, Nadia S. Villar*, María C. De Angelis*, Matías E. Gómez, Eduardo Saint Martin, Marta Spinetto.

Servicio de Analítica de Medicamentos. Departamento de Química y Física, Instituto Nacional de Medicamentos.

Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica.

Contacto: analitica@anmat.gov.ar

*Estos autores contribuyeron equitativamente al desarrollo de este trabajo.

INTRODUCCIÓN

El Ministerio de Salud de la Nación cuenta con diferentes programas destinados a la provisión gratuita de medicamentos, entre los cuales se encuentra el Programa Nacional de Salud Sexual y Procreación Responsable (PNSSyPR). El mismo fue creado por la Ley Nacional N° 25.673 con el fin de contribuir a mejorar la estructura de oportunidades para el acceso a una atención integral de la salud sexual y reproductiva. Durante los últimos trece años el Departamento de Química y Física del Laboratorio Nacional de Control del Instituto Nacional de Medicamentos (INAME) recibió aproximadamente 500 lotes de especialidades medicinales provenientes del PNSSyPR para ser evaluados mediante procedimientos de control de calidad antes de ser distribuidos en el territorio Nacional.

La relevancia que tiene esta clase de medicamentos en el área de la salud conlleva la reponsabilidad inherente de responder a estos requerimientos en tiempo y forma. Por este motivo, y con el fin de optimizar los tiempos de análisis y la productividad, se trabajó en el desarrollo y la validación de metodologías de análisis empleando la técnica de Cromatografía Líquida Ultra Rápida (UHPLC) para las siguientes especialidades medicinales anticonceptivos: Etinilestradiol 0,03 mg/Levonorgestrel 0,15 mg por gragea; Levonorgestrel 0,75 mg por gragea/ comprimido; Levonorgestrel 0,03 mg por gragea; Etinilestradiol 0,02 mg/Gestodeno 0,075 mg por comprimidos y Desogestrel 0,075 mg por comprimidos (Fig.1)

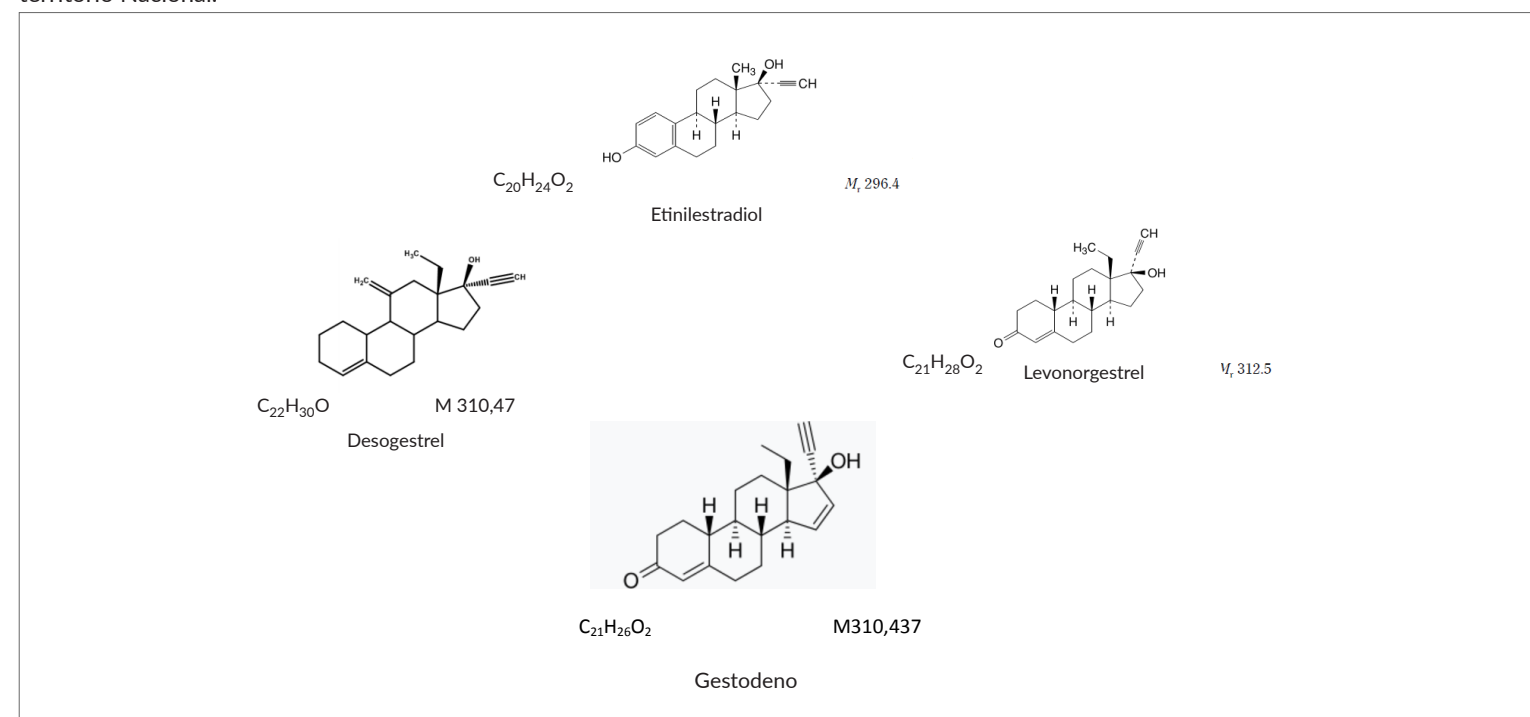


Figura 1. Estructura química de las especialidades medicinales empleadas en los ensayos.

OBJETIVO

Disminuir el tiempo analítico utilizando una metodología de cromatografía líquida de alta performance ultrarrápida a fin de dar respuesta eficiente y segura a los requerimientos impartidos por el Ministerio de Salud de la Nación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un cromatógrafo líquido ultra rápido SHIMADZU NEXERA, UHPLC (Sistema bombas binario LC-30AD, Horno de columnas CTO-30A, Desgasificador DGU-20A3R, Inyector automático SIL-30AC, Detector PDA SPD-M20A), columnas cromatográficas 50 mm x 2,1 dp 2,2 y 1,9 μ m (Shimi-pack; Hypersil gold y Reprisil Gold). Cromatógrafo líquido Hewlett Packard 1100 HPLC (Sistema bomba cuaternario G1311A, Desgasificador DGU-20A3R, Inyector automático G1313A, Detector VWD G1314A), columnas de 150 mm x 4,6, dp 5 μ m (Supelcosil, Hypersil). Solventes Acetonitrilo HPLC y Agua calidad HPLC, microbalanza Sartorius, estándares primarios de USP y EP. Como base para el desarrollo se emplearon las metodologías codificadas en Farmacopea Británica de los mencionados principios activos, en las cuales figura la realización de los ensayos por HPLC.

Las metodologías desarrolladas y validadas por UHPLC, corresponden a métodos isocráticos en fase reversa para lo cual se emplean columnas cromatográficas de C-18 encapada de 50 mm de longitud x 2,1 mm, diámetro de partícula 2,2 y 1,9 μ m. Como fase móvil se emplea una mezcla de agua y acetonitrilo, la temperatura del horno se mantiene en 38°C y la longitud de onda de lectura es de 215 nm y 240 nm, dependiendo la técnica. Estos métodos permiten la cuantificación de los principios activos Etinilestradiol y Levonorgestrel en las siguientes presentaciones:

- Etinilestradiol 0,03 mg/ Levonorgestrel 0,15 mg por gragea;
- Levonorgestrel 0,75 mg por gragea/ comprimido,
- Levonorgestrel 0,03 mg por gragea.

Por otro lado, se llevó a cabo el desarrollo y la validación de un método isocrático por UHPLC para la cuantificación del principio activo Desogestrel, que ingresa en la forma Desogestrel 0,075 mg por gragea. Para esto se emplearon columnas cromatográficas de C-18 encapada de 100mm de longitud x 4,0 mm, diámetro de partícula 2,2 micrometros. La fase móvil empleada fue una mezcla de metanol y agua (98:2), la temperatura del horno fue 38 °C y la longitud de onda de lectura fue de 210 nm.

RESULTADOS

Durante la puesta a punto de las metodologías y las validaciones se evaluaron los atributos de especificidad frente a posibles degradados sometiendo al activo, al producto y a los placebos posibles a condiciones de stress (ácida, básica, oxidativa, reductora, térmica y fotolítica), se evaluó la linealidad de los métodos entre el 50%-150% de la concentración de trabajo, la precisión del sistema, la repetibilidad, la exactitud y la retención en filtros (Nylon, teflón, viales autofiltrantes). Se evaluó la robustez de los métodos realizando modificaciones deliberadas en la concentración del solvente orgánico en la fase móvil, modificando la columna cromatográfica en lote de una y diferentes marcas, y variando la temperatura del horno y el flujo de fase móvil.

En todos los casos se pudo corroborar que, con los métodos desarrollados, se obtiene la separación los principios activos de todos los posibles degradados, así como también de los excipientes que pudiesen estar presentes. Todos los métodos mostraron ser precisos y exactos. Además, las modificaciones en las condiciones cromatográficas llevadas a cabo no afectaron los resultados.

Con la tecnología de Cromatografía líquida Ultra Rápida, se logró una disminución en los tiempos de corrida cromatográfica en un 70%, pasando de corridas de 10 minutos por HPLC a 3 minutos por UHPLC. Estos números se traducen en una mayor capacidad de análisis de muestras por jornada laboral, pudiendo ser analizados 7 lotes (UHPLC) en lugar de 2 (HPLC).

Por HPLC, realizar el ensayo de Uniformidad de Unidades de Dosificación por Contenido para 7 lotes, de estos productos, requiere 3 días consecutivos de trabajo, mientras que por UHPLC se requiere sólo uno.

En las Figuras 2 y 3 se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos mediante ambas tecnologías.

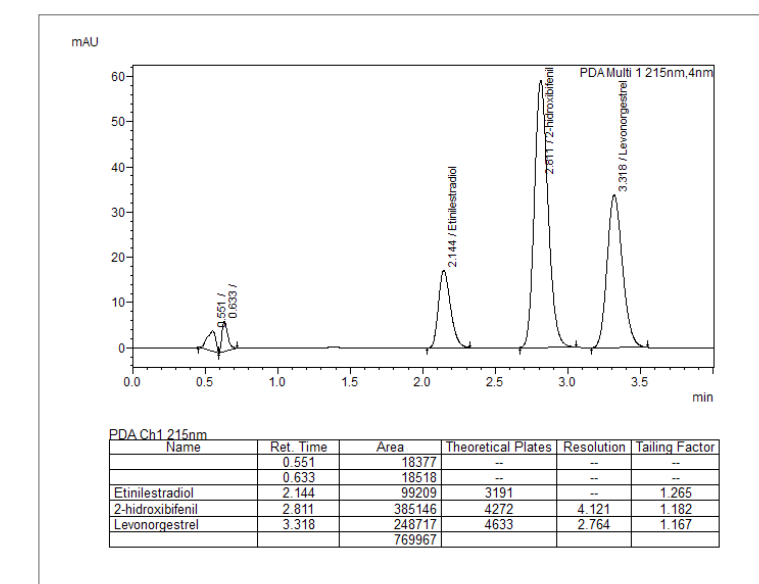


Figura 2. Cromatograma estándar de referencia UHPLC

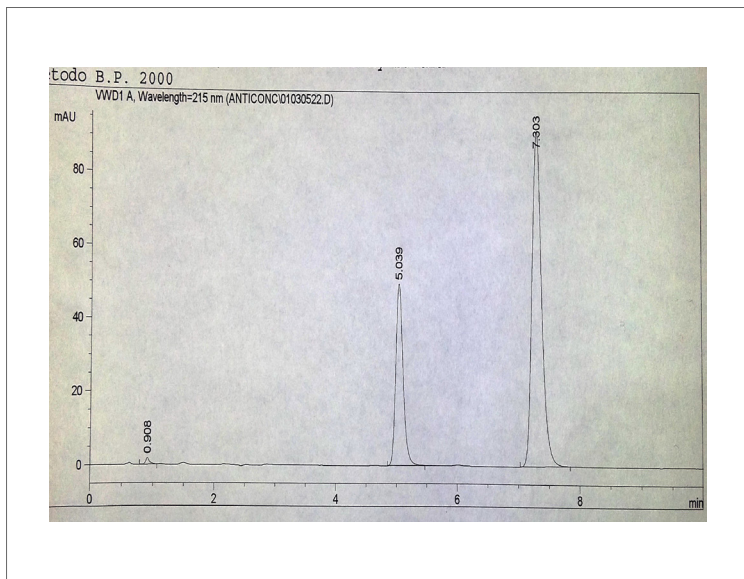


Figura 3. Cromatograma estándar de referencia HPLC

En el año 2014, con la implementación de las metodologías antes mencionadas se pudo reducir el tiempo y los solventes requeridos para su análisis tal como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Ensayo de Uniformidad de Unidades de Dosificación

Análisis de 1 lote de producto	Método por HPLC	Método por UHPLC
Tiempo requerido	200 min	60 min
Consumo de solvente orgánico	100 ml	6 ml

Se observó que los resultados son óptimos con una disminución del consumo de solventes nocivos para el medio ambiente en un 94%; dado que con esta nueva tecnología se emplean flujos de alrededor de 0,2 ml/min, mientras que por HPLC se emplean comúnmente flujos entre 1 y 2 ml/min. En la Figura 4 se muestra como resultó afectado el consumo de solvente y los tiempos de análisis al emplear esta nueva tecnología (UHPLC) para el análisis del total de lotes ingresados durante los años 2014 y 2015 respecto de los requeridos para llevar a cabo los ensayos por HPLC.

Lotes analizados en 1 año: 68

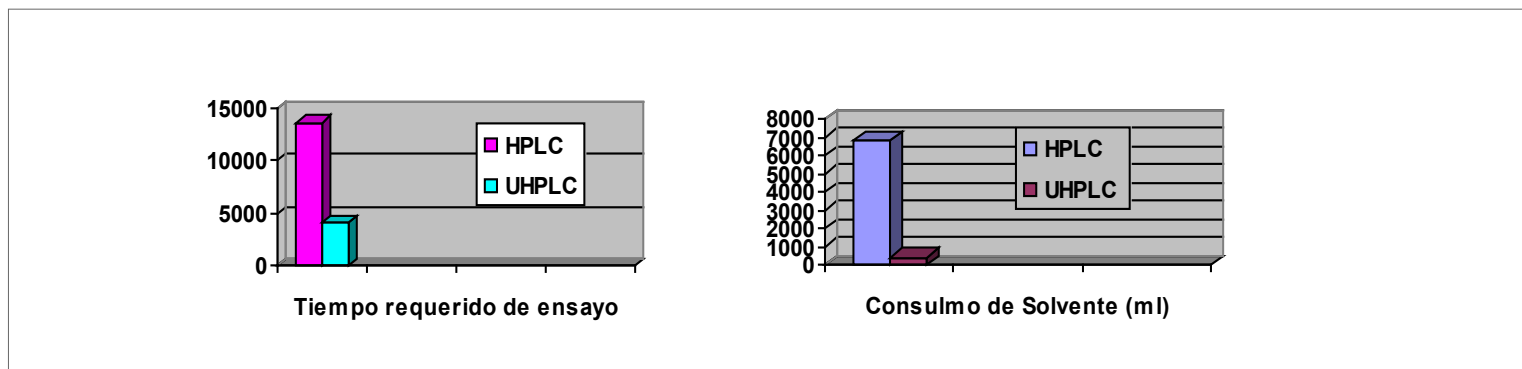


Figura 4. Comparativa de tiempos requeridos y consumo de solvente entre las técnicas de HPLC y UHPLC para el análisis de lotes medicinales ingresados 2014 y 2015.

CONCLUSIONES

La adquisición de los equipos de Cromatografía líquida Ultra Rápida (UHPLC) y el desarrollo de las metodologías para el análisis de los productos del PNSSyPR permitió aumentar la productividad y acelerar los tiempos de respuesta requeridos por el Ministerio de Salud de la Nación a fin de proceder a la distribución de los anticonceptivos alcanzados por el programa, de manera eficiente y segura, y garantizando a la comunidad el acceso a una medicación de calidad.

La virtud de la técnica no sólo radica en la reducción de los tiempos de análisis, sino que además permite optimizar recursos humanos y equipamiento dado que, tal como se mostró, la capacidad de analizar siete lotes de producto por día, empleando un único cromatógrafo de UHPLC permite contar con la disponibilidad de los otros equipos del Departamento de Química y Física para la resolución de otras muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica. Farmacopea Argentina, edición 7; 2013.
- Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de Métodos Analíticos; 2001.
- *European Pharmacopoeia Commission*. Farmacopea Europea, edición 8; 2013.
- Quattrocchi OA; de Andrizzi ZA; Laba RF. Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica; 1992.