



## Validación de limpieza en el laboratorio farmacéutico de la Dirección Nacional de Sanidad de las Fuerzas Armadas

### Validation of cleaning procedures in the pharmaceutical laboratory of the Armed Forces National Health Direction

Cap. (Q.F.) Jeannette Araújo <sup>a</sup>, Cap. (Q.F.) Martín Daners <sup>a</sup>, Cap. (Q.F.) Mariela Falero <sup>a</sup>, Tte. 1º (Q.F.) Sabrina Laulhé <sup>a</sup>, Tte. 2º (Q.F.) Mariana Poggi <sup>a</sup>.

(a) Laboratorio Farmacéutico de la Dirección Nacional de Sanidad de las Fuerzas Armadas. Montevideo. Uruguay.

#### RESUMEN

La elaboración de productos farmacéuticos implica un meticuloso control de cada etapa del proceso ya que el público objetivo constituye una población vulnerable. Es fundamental asegurar la limpieza de los equipos de fabricación a efectos de evitar la contaminación cruzada. Se validó la limpieza de equipos de fabricación de comprimidos. Se dividió el proceso en compresión previa granulación vía húmeda y compresión directa, a partir del estudio de riesgo se seleccionó el activo Trimetoprim en el producto Sulfaprim o Sulfaprim fuerte para granulación vía húmeda y el activo Bromazepan en el producto Bromazepan 6 D.N.S.FF.AA. para compresión directa. Se aplicó el procedimiento de limpieza. Se calculó el límite superficial de principio activo adoptando el criterio de *Fourman* y *Mullen*. El muestreo se realizó mediante hisopado. Los métodos analíticos HPLC y UV se validaron para demostrar que son aptos para recuperar y determinar trazas de contaminantes en la superficie de los equipos. Se hisoparon los equipos usados en 3 lotes consecutivos de cada producto. Todos presentaron valores de principio activo inferiores al límite permitido.

**PALABRAS CLAVE:** Contaminación; Contaminantes Ocupacionales del Aire; Estudios de Validación.

#### ABSTRACT

The elaboration of pharmaceutical products implies a meticulous control of each stage of the process since the target public constitutes a vulnerable population. It is essential to ensure the cleanliness of the manufacturing equipment in order to avoid cross contamination. The cleaning of tablet manufacturing equipment was validated. The process was divided into wet granulation and direct compression, from the risk study the active ingredient Trimethoprim was selected in the product Sulfaprim or Sulfaprim strong for wet granulation, and the active Bromazepan in the product Bromazepan 6 D.N.S.FF.AA. for direct compression. The cleaning procedure was applied. The surface limit of active principle was calculated adopting the *Fourman* and *Mullen* criterion. Sampling was performed by swabbing. The HPLC and UV analytical methods were validated to demonstrate that they are capable of recovering and determining traces of contaminants on the surface of the equipment. The used equipment was swabbed in 3 consecutive lots of each product. All of them showed values of the active principle lower than the allowed limit.

**KEY WORDS:** Contamination; Air Pollutants, Occupational; Validation Studies.

Recibido para evaluación: Octubre 2017

Aceptado para publicación: Febrero 2018

Correspondencia: Av. 8 de Octubre 3020. C.P.11600. Montevideo. Uruguay. Tel.: (+598)24876666 int. 1669.

E-mail de contacto: jaraujo@dnsffaa.gub.uy

## INTRODUCCIÓN

La elaboración de productos farmacéuticos se rige por las Buenas Prácticas de Manufactura, Good Manufacturing Practices en inglés. Estas normas constituyen estándares internacionales de calidad para la industria farmacéutica, adoptados en nuestro país por la autoridad sanitaria, que aseguran que el producto farmacéutico cumple con los requisitos de calidad y seguridad necesarios.

Uno de los aspectos incluidos en las Buenas Prácticas de Manufactura, consiste en garantizar la limpieza de los equipos utilizados en la elaboración de modo de prevenir la contaminación cruzada entre los múltiples productos que se fabrican en un mismo equipo. Esto se logra mediante la validación de la limpieza de los equipos (1).

La validación no se realiza sobre todos los principios activos utilizados sino sobre aquellos considerados críticos. Para ello se considera el caso de un producto contaminado con el activo más peligroso y aquel producto que en caso de presentar contaminación expondría de forma más importante al consumidor final (mayor dosis diaria).

Una vez seleccionados los principios activos se debe determinar el límite de limpieza, esto significa la máxima cantidad de activo permitida en la superficie del equipo, de manera que no constituya un riesgo potencial de contaminación para el producto que se va a elaborar posteriormente.

Luego de aplicar el procedimiento de limpieza se determina la cantidad de principio activo remanente. Si la misma es menor al límite podemos asegurar que la limpieza es adecuada, obteniéndose un producto seguro para el usuario al garantizar la ausencia de otros productos contaminantes.

## OBJETIVO

Verificar la efectividad del proceso de limpieza para remover los residuos de la superficie de los equipos de fabricación de comprimidos.

## MATERIALES

Equipos: Espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 25, HPLC Waters 600E.

Equipos del sector comprimidos utilizados en la fabricación de comprimidos:

- Mezcladora Werner Pfleiderer
- Granulador Oscilante
- Secador Lecho Fluido Glatt
- Comprimidora Manesty
- Desempolvador
- Mezclador en V
- Mortero

Procedimiento de limpieza del sector Comprimidos: Técnica analítica para Bromazepan y Trimetoprim

## METODOLOGÍA

El proceso de validación de limpieza requiere la selección del o los principios activos críticos, cálculo del límite de limpieza, selección y validación de técnicas analíticas y validación de limpieza propiamente dicho, es decir, la determinación de la cantidad de principio activo crítico remanente en cada equipo luego de aplicado el procedimiento de limpieza.

La fabricación de comprimidos se realiza por compresión directa de mezcla de polvos o por compresión previa granulación vía húmeda. En cada caso se define un tren de equipos, como el conjunto de equipos que entran en contacto directo con el producto farmacéutico en cualquiera de las etapas de su elaboración. En este trabajo se validaron ambos trenes de equipos.

La validación debe realizarse sobre un mínimo de tres lotes que contengan los principios activos seleccionados en condiciones normales de fabricación.

### 1- Selección de principios activos

Se realizó un estudio de riesgo para seleccionar los principios activos críticos. Durante el mismo se valoraron parámetros clave para determinar la peligrosidad de los activos, se asignaron puntajes a los mismos para confeccionar la matriz del estudio de

<b>Solubilidad en agua:</b> la mayor parte de la limpieza se realiza con agua o con soluciones acuosas. Un activo poco soluble en agua lógicamente tendrá menos probabilidades de ser removido exitosamente en la limpieza.	<b>Descripción</b>		<b>Puntaje</b>
	Muy soluble		1
	Libremente soluble		1
	Soluble		2
	Moderadamente soluble		2
	Levemente soluble		3
	Muy levemente soluble		3
	Prácticamente insoluble		3
Insoluble		3	
<b>Dosis:</b> los activos con dosis baja generalmente poseen un margen terapéutico estrecho, por lo tanto su aparición como contaminación cruzada en otro producto, aunque sea en bajas cantidades, puede tener alta peligrosidad.	<b>Dosis terapéutica diaria mínima (mg)</b>		<b>Puntaje</b>
	> 1000 mg		1
	100 - 1000		2
	10 - 99		3
	1 - 9		4
< 1		5	
<b>Toxicidad:</b> determinada mediante la LD50 en ratas, por vía oral, está directamente relacionada con la peligrosidad del activo.	<b>LD50 (mg/Kg)</b>	<b>Descripción</b>	<b>Puntaje</b>
	15000	Prácticamente no tóxico	1
	5000 - 15000	Levemente tóxico	1
	500 - 5000	Moderadamente tóxico	2
	50 - 500	Muy tóxico	3
	may-50	Extremadamente tóxico	4
< 5	Súper tóxico	5	
<b>Dificultad de limpieza:</b> se consultó con los operarios del área para conocer qué productos les generaban más dificultad a la hora de la limpieza.	Se asignó un valor de 1 a los productos difíciles de limpiar, al resto se les asigna el valor 0.		

Figura 1. Matriz de riesgo.

riesgo, según la figura 1. La matriz incluyó todas las especialidades de comprimidos fabricadas.

## 2- Cálculo de límites

Para determinar el límite de limpieza se adoptó el método desarrollado por *Fourman* y *Mullen* (2) de la compañía Eli Lilly.

Se consideraron tres criterios para el cálculo del límite: Límite residual de limpieza (L1), cálculo de límite de 10 ppm (L2) y límite visual (L3). En este trabajo se consideró como límite de limpieza el menor de ellos, es decir, el más exigente. Las expresiones para el cálculo en base a los tres criterios son las siguientes:

• **Límite residual de limpieza (L1):** En este caso se considera que no más de 0.1% de la dosis terapéutica de cualquier producto puede aparecer en la máxima dosis del producto siguiente. Se establece que se fabrica el producto A y luego el producto B.

$$L1 \text{ (mg/mL)} = D \text{ mín A} \times F \times LB \times \text{Áh} / \text{máx DB} \times \text{á comp.}$$

Donde: **D mín A** es la mínima dosis diaria del principio activo que se desea limpiar (A) necesaria para obtener un efecto terapéutico expresada en mg/día, **F** es el factor de seguridad (0.001), **LB** es el tamaño de lote del producto que se fabricará a continuación (B) expresado en unidades posológicas (UP), **Áh** es la superficie hisopada en cm<sup>2</sup>, **máx DB** es la dosis diaria máxima de B en UP/día y **á comp** es la superficie compartida del tren de equipos.

• **Cálculo de límite de 10 ppm (L2):** En este caso se considera que no más de 10 ppm del principio activo A pueden estar presentes en el producto siguiente B.

$$L2 \text{ (mg/mL)} = 10 \times LB \times \text{Áh} / \text{á comp}$$

Dónde: 10 es el factor de conversión de unidades, LB es el lote menor del activo B en Kg, Áh es la superficie hisopada en cm<sup>2</sup>, á comp es la superficie compartida del tren de equipos.

• **Límite visual (L3):** Es el límite que es capaz de detectar el ojo humano: 4 µg/cm<sup>2</sup>, por lo tanto 0.4 mg/100 cm<sup>2</sup>.

Para el agente de limpieza (cloruro de benzalconio) el menor valor del límite está dado por la concentración máxima permitida (MACO) según la expresión: **MACO (ug) = 1 ppm x Tmín B x 1000,**

dónde: 1 ppm es el factor de limpieza (entre 1 y 10 ppm, se toma el más crítico) en mg/Kg,  $T_{\min}$  B es el menor tamaño de un lote de comprimidos (tamaño de lote menor del activo B) (kg), 1000 es el factor de conversión de unidades.

### 3- Elección y validación de los métodos analíticos:

**a-** Método de muestreo (3): hisopado de superficie con hisopos de poliéster.

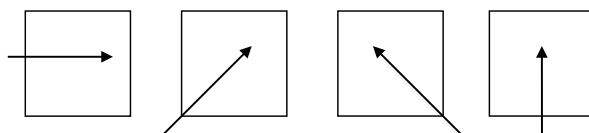
i. Humedecer apenas el hisopo en etanol 96°.

ii. Hisopar un cuadrado de 10 cm de lado sobre la superficie del equipo en un punto crítico, pasando el hisopo 20 veces en cada dirección (figura 2).

iii. Colocar el hisopo en un tubo de ensayo de vidrio limpio y seco y taparlo con papel de film.

**b-** Métodos analíticos:

Luego de seleccionados los principios activos se determina el método analítico, el cual debe ser específico, capaz de identificar y cuantificar a los mismos. Según la técnica analítica a emplear se estudia la posible interferencia de otros componentes como por ejemplo el agente de limpieza. Las técnicas analíticas se validan según la United States Pharmacopoeia (USP) y la International Conference of Harmonization, ICH, (4, 5), de esta forma se asegura que las mismas son aptas para cuantificar los principios activos seleccionados, con exactitud y precisión adecuadas (6).



**Figura 2.** Método de muestreo: hisopado de superficie con hisopos de poliéster. (Punto 3a.ii.)

### Hisopados de equipos

Se hisoparon todos los componentes de cada tren de equipos, los mismos se detallan en la figura 3.

El hisopado se realizó usando la técnica indicada en el punto 3a. En el caso de piezas irregulares, se hisopó una superficie conocida y posteriormente se corrigió el resultado extrapolándolo a 100 cm<sup>2</sup>. Luego de realizar el hisopado se procedió según técnica analítica validada.

### RESULTADOS

Se seleccionaron a partir del estudio de riesgo los principios activos críticos Bromazepan y Trimetoprim, de este modo se contemplan los métodos de fabricación de comprimidos, compresión directa y compresión por vía húmeda respectivamente. Los límites de limpieza determinados fueron 7.7E<sup>-3</sup> mg/mL para el Bromazepan y 2.7 E<sup>-2</sup> mg/mL para Trimetoprim. Para el Cloruro de Benzalconio el límite determinado fue de 1.02 mg/mL.

Los métodos analíticos elegidos y validados fueron HPLC para el principio activo Trimetoprim, y espec-

Granulación vía húmeda	Compresión directa
1. Tolva de mezcladora de cintas Werner Pfleiderer	1. Mortero
2. Tamiz de mezcladora de cintas Werner Pfleiderer	2. Mezclador en V
3. Mezcladora de cintas Werner Pfleiderer	3. Tolva de mezcladora de cintas Werner Pfleiderer
4. Cuerpo del granulador oscilante	4. Tamiz de mezcladora de cintas Werner Pfleiderer
5. Malla gruesa del granulador oscilante	5. Mezcladora de cintas Werner Pfleiderer
6. Malla fina del granulador oscilante	6. Tolva de comprimidora Manesty
7. Secadora de lecho fluido Glatt	7. Comprimidora Manesty
8. Tolva de comprimidora Manesty	8. Desempolvador
9. Comprimidora Manesty	
10. Desempolvador	

**Figura 3.** Tren de equipos estudiados para cada proceso.

	Técnica UV para bromazepan	Técnica HPLC para trimetoprim
Límite de cuantificación (mg/mL)	2.7E <sup>-4</sup>	5,5 E <sup>-4</sup>
Linealidad y exactitud (coeficiente de correlación lineal = r <sup>2</sup> )	0.9990	0.9924
% Recuperación en hisopo	94.1	95.8
% Recuperación en superficie	88.5	73.7
Precisión (Desviación estándar relativa = RSD)	10	10

**Figura 4.** Parámetros de Validación de las Técnicas Analíticas.

troscopia UV para el Bromazepan, Los resultados obtenidos para la validación de las técnicas analíticas se presentan en la figura 4.

Los resultados de los hisopados realizados a los equipos utilizados durante la compresión estuvieron en todos los casos por debajo del límite de limpieza. Dichos resultados se muestran en la figura 5.

## DISCUSIÓN

El estudio de riesgo permitió determinar un principio activo crítico en cada proceso de fabricación de comprimidos a efectos de monitorear la limpieza de los equipos de fabricación. De este modo se tiene la certeza de que si la superficie se encuentra libre de dicho principio activo la limpieza del equipo será adecuada. Al validar ambas formas de compresión se asegura la evaluación de todos los equipos de la sección.

Los métodos analíticos elegidos y validados fueron HPLC para el principio activo Trimetoprim, debido a que es un método específico que permite identificar el activo buscado además de cuantificarlo. Esto es especialmente importante en este caso dado que el producto es una asociación de principios activos (trimetoprim y sulfametoxazol). En el caso del Bromazepam el método analítico seleccionado fue espectroscopia UV, debido a que es el único principio activo en la formulación y el límite de limpieza es suficientemente alto para utilizar esta técnica. Se estudió la interferencia del agente de limpieza, cloruro de benzalconio, por espectrometría UV. El límite calculado para el

agente de limpieza es mayor al límite de limpieza para bromazepam por lo tanto puede usarse este método.

Se estudiaron los parámetros de validación indicados según USP <1225> y las guías ICH, concluyendo que los métodos analíticos son aptos para determinar trazas de contaminantes en la superficie de los equipos.

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de los hisopados, el procedimiento de limpieza permite obtener equipos de producción libres de trazas de contaminantes evitando la contaminación cruzada entre los diferentes productos que se fabrican dentro de la sección Comprimidos. Las técnicas analíticas utilizadas se encuentran validadas según los criterios de USP e ICH por lo cual están aptas para determinar trazas de Bromazepam y Trimetoprim en superficie dentro de los rangos de trabajo.

Validación de Limpieza Sulfaprim Fuerte Lote: 9832				Promedio
Área estándar	3531498	3527399	3529103	3529333
Masa (mg)	29,4			
Potencia	100			
pps	0,25			
% R superficie	73,7			
L1 (mg/mL)	0,0265			

Equipo	Área 1	Área 2	Promedio	mg/ml
Malla fina	245283	253784	249534	0,0028
Malla gruesa	21261	19524	20393	0,0002
Glatt	17823	24182	21003	0,0002
Mezclador en cinta	< LD*	< LD		
Tamiz mezcladora en cinta	< LD	< LD		
Cilindro desempolvador	< LD	< LD		
Granulador oscilante	< LD	< LD		
Máquina de comprimir	94458	100851	97655	0,0011
Tolva de máquina de comp.	< LD	< LD		
Tolva mezcladora en cinta	< LD	< LD		

LD\*: Límite de detección

Validación de Limpieza Sulfaprim Fuerte Lote: 9833				Promedio
Área estándar	4010913	3988098	3985531	3994847
Masa st (mg)	31,7			
Área estándar 2	3661145	3668794	3679466	3669802
Masa st 2 (mg)	28,4			
Potencia	100			
pps	0,25			
% R superficie	73,7			
L1 (mg/mL)	0,0265	HPLC		
LUV (absorbancia)	0,1	UV		

Equipo	Área 1	Área 2	Promedio	mg/ml st1	mg/ml st2	Promedio
Malla fina	95966	96839	96403	0,00104	0,00101	0,00102
Malla gruesa	17535	13911	15723	0,00017	0,00016	0,00017
Glatt	127977	134738	131358	0,00141	0,00138	0,00139
Mezclador en cinta	19598	16886	18242	0,00020	0,00019	0,00019
Tamiz mezcladora en cinta	21021	25258	23140	0,00025	0,00024	0,00025
Cilindro desempolvador	18081	23294	20688	0,00022	0,00022	0,00022
Granulador oscilante	17059	13826	15443	0,00017	0,00016	0,00016
Máquina de comprimir	81286	76086	78686	0,00085	0,00082	0,00083
Tolva de máquina de comp.	17407	12019	14713	0,00016	0,00015	0,00016
Tolva mezcladora en cinta	17909	15747	16828	0,00018	0,00018	0,00018

Validación de Limpieza Sulfaprim Fuerte Lote: 9834				Promedio
Área estándar	4010913	3988098	3985531	3994847
Masa st (mg)	31,7			
Área estándar 2	3661145	3668794	3679466	3669802
Masa st 2 (mg)	28,4			
Potencia	100			
pps	0,25			
% R superficie	73,7			
L1 (mg/mL)	0,0265			

Equipo	Área 1	Área 2	Promedio	mg/ml st1	mg/ml st2	Promedio
Malla fina	43256	36555	39906	0,00043	0,00042	0,00042
Malla gruesa	10889	13666	12278	0,00013	0,00013	0,00013
Glatt	< LD	< LD				
Mezclador en cinta	13592	11917	12755	0,00014	0,00013	0,00014
Tamiz mezcladora en cinta	16047	12584	14316	0,00015	0,00015	0,00015
Cilindro desempolvador	16711	11615	14163	0,00015	0,00015	0,00015
Granulador oscilante	22973	20590	21782	0,00023	0,00023	0,00023
Máquina de comprimir	39364	37167	38266	0,00041	0,00040	0,00041
Tolva de máquina de comp.	24569	28495	26532	0,00028	0,00028	0,00028
Tolva mezcladora en cinta	< LD	< LD				

Figura 5. Cantidad de principio activo presente en cada equipo.

Validación de Limpieza Bromazepan 6 Lote: 9864 Primer hisopado		Equipo	Área 1	mg/ml st1	mg/ml st2	Promedio
Área estándar 1	0,52695	Mortero	0,046298	0,00087	0,00087	0,00044
Masa st 1 (mg)	44	Mezclador en V	0,054575	0,00103	0,00103	0,00051
Área estándar 2	0,58463	Desempolvador	0,069212	0,00130	0,00130	0,00065
Masa st 2 (mg)	48,9	Máquina de comprimir	0,05086	0,00096	0,00096	0,00048
Potencia	99,6	Tolva de máquina de comp.	0,055233	0,00104	0,00104	0,00052
pps	0	Mezclador de cintas	0,048829	0,00092	0,00092	0,00046
% R superficie	88,5	Tamiz de mezclador de cintas	0,043945	0,00083	0,00083	0,00041
L1 (mg/mL)	0,0077	Tolva de mezcladora de cinta	0,052359	0,00098	0,00099	0,00049

Validación de Limpieza Bromazepan 6 Lote: 9864 Segundo hisopado		Equipo	Área 1	mg/ml st1	mg/ml st2	Promedio
Área estándar 1	0,52695	Mortero	0,049507	0,00093	0,00093	0,00093
Masa st 1 (mg)	44	Mezclador en V	0,034699	0,00065	0,00065	0,00065
Área estándar 2	0,58463	Desempolvador	0,029692	0,00056	0,00056	0,00056
Masa st 2 (mg)	48,9	Máquina de comprimir	0,035206	0,00066	0,00066	0,00066
Potencia	99,6	Tolva de máquina de comp.	0,034009	0,00064	0,00064	0,00064
pps	0	Mezclador de cintas	0,045301	0,00085	0,00085	0,00085
% R superficie	88,5	Tamiz de mezclador de cintas	0,042732	0,00080	0,00080	0,00080
L1 (mg/mL)	0,0077	Tolva de mezcladora de cinta	0,016664	0,00031	0,00031	0,00031

Validación de Limpieza Bromazepan 6 Lote: 9864 Tercer hisopado		Equipo	Área 1	mg/ml st1	mg/ml st2	Promedio
Área estándar 1	0,555	Mortero	0,034078	0,00062884	0,0006263	0,00063
Masa st 1 (mg)	45,5	Mezclador en V	0,038569	0,00071171	0,00070884	0,00071
Área estándar 2	0,52418	Desempolvador	0,084471	0,00155873	0,00155245	0,00156
Masa st 2 (mg)	42,8	Máquina de comprimir	0,053946	0,00099546	0,00099145	0,00099
Potencia	99,6	Tolva de máquina de comp.	0,04746	0,00087577	0,00087224	0,00087
pps	0	Mezclador de cintas	0,019811	0,00036557	0,0003641	0,00036
% R superficie	88,5	Tamiz de mezclador de cintas	0,036972	0,00068224	0,00067949	0,00068
L1 (mg/mL)	0,0077	Tolva de mezcladora de cinta	0,033475	0,00061771	0,00061522	0,00062

Figura 5. Cantidad de principio activo presente en cada equipo.

## REFERENCIAS

(1) Ministerio de Salud Pública. Uruguay. Guía de Validación de Limpieza. 7 páginas. Disponible en: [http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/GUIA\\_DE\\_VALIDACION\\_DE\\_LIMPIEZA.pdf](http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/GUIA_DE_VALIDACION_DE_LIMPIEZA.pdf) [Consulta 15/07/2017].

(2) Fourman G, Mullen M. Determining Cleaning Validation Acceptance Limits for Pharmaceutical Manufacturing Operations. Pharm Tech 1993; 17(4):54.

(3) World Health Organization. Supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation. Technical Report Series No.937, WHO 2006. 72 páginas. Disponible en: [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/quality\\_assurance/SupplementaryGMP-ValidationTRS937Annex4.pdf](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/SupplementaryGMP-ValidationTRS937Annex4.pdf) [Consulta 20/06/2017].

(4) ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). 17 páginas. Disponible en: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf), ICH Guideline Q2A. [Consulta 20/08/2017].

(5) Farmacopea de los Estados Unidos de América Formulario Nacional. USP 38-NF 33. 2015. Volumen 1. Capítulos Generales <1225>. Validación de procedimientos farmacopeicos p.1581- 1587.

(6) Estévez C, Quiroga F, Rojas J, Hernández H. Validación de una metodología analítica para la determinación de acetaminofén en procesos de limpieza. Rev Col Cienc Quim Farm 2003; 32(2):103-110.