



NACIONAL



RESOLUCION 288/1990
MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL (M.S. y A.S.)

Regulación técnica para control de productos higiénicos descartables de uso externo e intravaginal. Aprobación. Derogación de la res. 1068/80.
del 28/11/1990; Boletín Oficial 18/03/1991

Artículo 1º -- Apruébase la regulación técnica para control de productos higiénicos descartables de uso externo e intravaginal que como anexos I, II y III, forma parte de la presente.

Art. 2º -- Derógase la res. 1068 del 14 de abril de 1980.

Art. 3º -- Dispónese un plazo de noventa (90) días a fin de que los establecimientos alcanzados por la presente se adecuen a esta reglamentación.

Art. 4º -- Las infracciones a la presente resolución serán sancionadas conforme lo reglado por la [ley 16.463](#).

Art. 5º -- Comuníquese, etc.

Kohan.

Anexo I

**REGULACION TECNICA PARA CONTROL DE PRODUCTOS ABSORBENTES HIGIENICOS
DESCARTABLES, DE USO EXTERNO E INTRAVAGINAL
PRODUCTOS DESCARTABLES DE USO EXTERNO**

1. Definición

1.1. Son considerados productos absorbentes descartables de uso externo, los artículos destinados al aseo corporal, aplicados directamente sobre la piel, con la finalidad de absorber o retener excreciones o secreciones orgánicas, tales como orina, heces, leche materna y las excreciones de naturaleza menstrual e intermenstrual.

1.2. Están comprendidos en este grupo, los absorbentes higiénicos femeninos de uso externo, los pañales para bebé, pañales para adultos y los absorbentes de leche materna.

2. Composición

Los productos absorbentes descartables de uso externo, están compuestos por:

2.1. Una capa de tela polimérica que permita el pasaje de fluidos orgánicos y que retenga las heces.

2.2. Un núcleo absorbente destinado a almacenar fluidos orgánicos que atraviesen la primera capa, compuesto por algodón hidrófilo, pulpa de celulosa virgen o materiales poliméricos absorbentes.

2.3. Una capa de apoyo estructural.

3. Requisitos de calidad

3.1. Las materias primas presentes en la composición de estos productos deberán ser de naturaleza atóxica y, para su confirmación serán sometidas obligatoriamente a los siguientes ensayos: Irritación primaria y sensibilización. Estos ensayos se efectuarán para cada tipo de materia prima empleada en la confección de los productos comprendidos en esta norma y se deberán repetir cada vez que se cambien las materias primas especificadas en el proceso de fabricación.

3.2 Los productos terminados, deberán ser sometidos a los siguientes ensayos: irritación primaria, irritación acumulativa y sensibilización. Estos ensayos se repetirán toda vez que cambie el proceso de fabricación, y se encuentran descriptos en el anexo 3 de esta norma.

4. Control de fabricación

4.1 Las empresas fabricantes deberán estar debidamente habilitadas para funcionar por la autoridad competente, adoptando las buenas prácticas de fabricación preconizadas por la Organización Mundial de la Salud.

4.2. Todas las materias primas y los productos terminados deberán ser analizados de acuerdo con métodos

capaces de verificar su inocuidad y sometidas a la evaluación microbiológica de orientación, con periodicidad variable, y de acuerdo con la naturaleza de cada material.

4.2.1. La evaluación microbiológica, deberá responder a los siguientes límites de aceptabilidad para una muestra de 5 g: Ausencia de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium sp.* o Clostridios sulfito reductores.

La cantidad de gérmenes aeróbicos mesófilos, no debe pasar de 1000 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de muestra.

4.2.2. En todos los casos se emplearán métodos de análisis de reconocida validez, descritos en el anexo 3 de esta norma.

4.2.3. Los ensayos deberán ser realizados en laboratorios de la propia empresa o en aquellos que estén sujetos al control de la autoridad competente.

4.3. Cada lote de productos deberá ser identificado mediante codificación impresa en el respectivo rótulo, que viabilice localizar y revisar en los libros de registros, todas las operaciones de fabricación e inspección practicadas durante los respectivos ciclos de producción.

4.3.1. Los rótulos deberán contener la marca del producto, el nombre de la empresa productora o fraccionadora, el nombre del responsable técnico y el número de registro.

4.4. Los documentos en que estén registrados los resultados de los ensayos de control de fabricación, aludidos en el ítem 4.2. deberán ser archivados en la empresa productora, por un período de cinco años, para permitir en cualquier momento la acción de la fiscalización sanitaria.

5. Almacenamiento

5.1. Los productos absorbentes descartables que se tratan en esta norma deberán ser almacenados en local seco y limpio, libre de roedores e insectos.

Anexo 2

PRODUCTOS ABSORBENTES DESCARTABLES DE USO INTRAVAGINAL

1. Definición

1.1. Son considerados productos absorbentes descartables de uso intravaginal, los artículos destinados a absorber o retener excreciones y secreciones menstruales e intermenstruales aplicados por inserción vaginal.

2. Composición

2.1. Los productos que se trata en esta norma deberán ser compuestos de fibras de algodón hidrófilo y/u otros materiales absorbentes que no contengan ingredientes farmacológicamente activos.

3. Requisitos de calidad

3.1. Las materias primas presentes en la composición de los productos deberán ser de naturaleza atóxica, para confirmación de la cual, serán sometidas obligatoriamente a los siguientes ensayos preclínicos: Citotoxicidad, irritación primaria y sensibilización. Estos ensayos se efectuarán para cada tipo de materia prima empleada en la confección de los productos comprendidos en esta norma y se deberán repetir cada vez que se cambien las materias primas, especificadas en el proceso de fabricación.

3.2. Los productos terminados deberán ser sometidos a los siguientes ensayos preclínicos: Irritación primaria, irritación acumulativa y sensibilización. Estos ensayos se repetirán cada vez que se cambie el proceso de fabricación.

4. Control de fabricación

4.1. Todas las materias primas componentes de los productos, deberán ser analizadas con métodos capaces de verificar su inocuidad y sometidas a una evaluación microbiológica de orientación, con periodicidad variable, de acuerdo con la naturaleza de cada material.

4.2 Los productos terminados también deberán ser analizados a través de métodos capaces de verificar su inocuidad.

4.2.1. El recuento de gérmenes deberá ser inferior a 1000 microorganismos por unidad elaborada. Garantizada esa condición, en ensayo microbiológico posterior, deberá demostrar ausencia de: *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y microorganismos anaeróbicos. Cuando el recuento microbiano se encuentra entre 500 y 1000 ufc por unidad de productos, se deberá proceder a la inmediata revisión en las condiciones de operación de fabricación.

4.2.2. Los ensayos de irritación primaria dérmica, irritación acumulativa y el de sensibilización, se realizarán de acuerdo con las técnicas descriptas del anexo 3 de esta norma.

4.2.3. Los ensayos deberán ser realizados en Laboratorios de la empresa o en aquellos que estén sujetos al control de la autoridad competente.

4.3. Las empresas que intervengan en la elaboración o fraccionamiento de productos comprendidos en esta

norma, deberán ser habilitadas por autoridad competente, con la dirección técnica de un profesional farmacéutico.

4.3.1. Los establecimientos, sus equipamientos e instalaciones dedicadas a las actividades enunciadas en el ítem anterior, así como los procesos de fabricación y de control químico-microbiológico, deberán responder a las buenas prácticas de fabricación, enunciadas por la Organización Mundial de la Salud.

4.3.2. El área y los equipamientos donde se realiza la fabricación de estos productos, deberán ser de uso exclusivo para dicha elaboración.

4.4. Los embalajes de los productos contemplados en esta norma, deberán reunir condiciones que impidan su contaminación.

4.4.1. Los rótulos deberán especificar la marca del producto, el nombre del establecimiento productor o fraccionador, nombre del responsable técnico y número de registro.

4.5. Cada lote del producto deberá ser identificado mediante codificación impresa en el respectivo rótulo que viabilice localizar y revisar en los libros de registros, todas las operaciones de fabricación e inspección practicadas durante los respectivos ciclos de producción.

4.6. Los documentos en que estén registrados los resultados de los ensayos de control de fabricación aludidos, en los ítems 4.1 y 4.2, deberán ser archivados en la empresa productora por un período de cinco años, para permitir en cualquier momento, la acción de la fiscalización sanitaria.

5. Almacenamiento

5.1. Los productos absorbentes descartables de que trata esta norma deberán ser almacenados en local seco y limpio, libre de roedores e insectos.

Anexo 3

ENSAYOS PRECLINICOS PARA PRODUCTOS DESCARTABLES DE USO EXTERNO Y DE USO INTRAVAGINAL

1. Irritación cutánea primaria

1.1 Objetivo

La presente técnica evalúa el potencial de irritación cutánea, después de una única aplicación de la sustancia a ser ensayada.

1.2 Materiales y métodos

1.2.1. Equipamiento

- * Estufa
- * Erlenmeyers
- * Pipetas de 1,0 ml
- * Rasurador
- * Jeringa de 1,0 ml.
- * Espátula
- * Balanza analítica
- * Aguja de inyección estéril
- * Gasa estéril
- * Cinta adhesiva hipoalérgica
- * Calibre
- * Esparadrapo
- * Lente de aumento

1.2.2. Soluciones

- * Solución isotónica de cloruro de sodio estéril
- * Agua destilada estéril

1.2.3. Animales

- * 6 (seis) conejos albinos, machos o hembras, de peso corpóreo de 2 a 3 kg

Los animales deben ser mantenidos en jaulas individuales en todo el período de la prueba, en sala de temperatura constante ($22 \pm 3^\circ \text{C}$) y de humedad relativa entre 30 a 70 %.

1.2.4. Selección de animales

1.2.4.1 Los animales que presentan reacción positiva en una prueba anterior de irritación cutánea, deberán ser excluidos de este ensayo (ver criterio para reacción positiva ítem 1.2.10.2)

1.2.4.2. Los animales que hayan presentado reacción, negativa en una prueba previa de irritación cutánea, sólo podrán ser utilizados luego de un período de descanso de por los menos una semana (ver ítem 1.2.10.2) para la validez de esta reutilización.

1.2.4.3. Después de rasurar los animales, observar si la piel de los mismos se encuentra íntegra, esto es, sin

ninguna lesión. Rechazar los animales que presenten problemas en la piel. Controlar el peso corporal de los animales al inicio y al final de la prueba.

Observación

Los animales que fueron usados para la prueba con sustancias que alteran el color de la piel no deben ser usados, para la prueba de irritación cutánea.

1.2.5. Preparación de los animales. Rasurar cuidadosamente cada animal en 4 (cuatro) áreas, de 2,5 cm² c/u.

Hacer 2 (dos) escoriaciones paralelas con una aguja de inyección esterilizada, evitándose el sangrado. Las áreas rasuradas superior e inferior del lado derecho del animal (áreas 2 y 4 de la figura I).

Las áreas rasuradas superior e inferior del lado izquierdo del animal deberán permanecer intactas (áreas 1 y 3 de la figura I).

1.2.6. Preparación de la muestra

Las muestras a aplicar deben tener una superficie de 2,5 cm² y ser previamente humedecidas a saturación con solución fisiológica estéril.

1.2.7. Aplicación del producto

Asegurar al animal delicadamente hasta que se calme.

Aplicar el producto sobre las 2 áreas rasuradas superiores (áreas 1 y 2 de la figura I), en cuanto a las 2 áreas inferiores (áreas 3 y 4 de Figura I) servirán como control.

1.2.8. Colocación del parche oclusivo

Después de la aplicación del producto, cubrir cada una de las 4 (cuatro) áreas rasuradas con una gasa estéril de 2,5 cm² cada una, la cual debe ser fijada a los pelos del animal con cinta adhesiva hipoalergénica o esparadrapo.

Todas las áreas rasuradas deben ser conjuntamente cubiertas con una gasa estéril, la cual debe ser envuelta alrededor del animal y fijada con cinta adhesiva hipoalérgica.

1.2.9. Lectura de las reacciones cutáneas:

Las reacciones cutáneas deben ser analizadas 24 y 72 horas después de la aplicación del producto.

Retirar el parche oclusivo 24 horas después de la aplicación del producto y efectuar la lectura.

Las áreas controles tienen como única finalidad, facilitar una comparación con las áreas ensayadas.

La evaluación de formación de edema, debe ser medida a través de un calibre y el cálculo del valor del edema se hace a través de la fórmula:

$$\frac{\text{Lat}}{2} - \frac{\text{Lac}}{2} = \text{Ed mm}$$

Donde

Lat = Lectura del área de prueba (íntegra y escoriada)

Lac = Lectura del área control (íntegra y escoriada)

Ed mm = Valor del edema en milímetros

La graduación de la intensidad de las reacciones cutáneas está basada en el método de Draize (1,2) Ver tabla I.

Observaciones

La lectura de las reacciones cutáneas que alteran el color de la piel.

En el caso de productos colorantes que alteran el color de la piel, dificultando la visualización de Eritema, la evaluación se hace de la siguiente forma:

1. En la lectura de 24 horas se hace la biopsia de las áreas aplicadas en 3 (tres) animales.

En el mismo sentido hecho para los 3 (tres) animales restantes en la lectura de 72 horas.

2. Se efectúa el examen macro y microscópico de las biopsias (Método de coloración HE y Van Gienson).

3. Una graduación microscópica de las reacciones cutáneas se encuentra descrita en la tabla II.

Figura I		Ilustración de las áreas peladas
1	2	1-2: áreas superiores
		3-4: áreas inferiores
		1-3: áreas s/escoriaciones
3	4	2-4: áreas c/escoriaciones
		1-2: área con sustancia de prueba
		3-4: área con controles

Denominación de las áreas peladas para la prueba:

Area 1	Piel íntegra (área de prueba).
Area 2	Piel escoriada (área de prueba).
Area 3	Piel íntegra (área control).
Area 4	Piel escoriada (área control).

Graduación de reacciones cutáneas

Tabla I

I.1. Formación de eritema

Grado 0 -- Piel normal:

Generalmente de color blanca, pudiéndose presentar coloración rosada.

Grado 1 -- Eritema leve:

La piel se presenta enrojecida, pudiendo estar localizada en todo el área.

Grado 2 -- Eritema moderado:

La piel se presenta roja, generalmente en toda el área.

Grado 3 -- Eritema definido:

La piel se presenta con enrojecimiento intenso y difuso, en toda el área.

Grado 4 -- Eritema severo:

La piel se presenta roja oscura, con leve formación de escaras (daño en profundidad).

I.2 -- Formación de edema

Grado 0 -- Ningún edema:

El valor del Edema (Ed mm) es igual a 0 (cero).

Grado 1 -- Edema leve:

El valor del Edema (Ed mm) debe estar comprendido entre 0,25 mm y 0,49 mm.

Grado 2 -- Edema moderado:

(Área con bordes bien definidos con edema perceptible).

El valor del Edema (Ed mm) debe estar comprendido entre 0,5 mm y 0,74 mm.

Grado 3 -- Edema definido:

El valor del Edema (Ed mm) debe estar comprendido entre 0,75 mm y 1 mm.

Grado 4 -- Edema severo:

El valor del Edema (Ed mm) es mayor de 1 mm pudiendo a veces ser mayor que el área de exposición.

Tabla 2

Graduación microscópica de las alteraciones cutáneas determinadas por productos que alteran el color de la piel.

II.1 Congestión

Grado 0 -- Normal:

Los vasos del tejido cutáneo aparecen normales.

Grado 1 -- Discreta:

Los vasos se muestran ligeramente turgentes en correspondencia con el aumento de flujo sanguíneo.

Grado 2 -- Intensa:

Excesivo flujo de sangre en los vasos.

II. 2 Inflamación

Grado 0 -- Normal:

No se percibe infiltración inflamatoria en los diversos planos del tejido cutáneo.

Grado 1 -- Discreto:

La infiltración inflamatoria se caracteriza por un pequeño número de células inflamatorias (polimorfonucleares y/o mononucleares), dispersas, pudiendo ser observadas o no en los diferentes planos del tejido cutáneo.

Grado 2 -- Moderado:

El infiltrado inflamatorio evidente (polimorfonucleares y/o mononucleares) podrá o no ser observado en varios planos de la piel.

Grado 3 -- Intensa:

En este caso el número de células inflamatorias es de tal magnitud que a veces perjudica la visualización de las estructuras de la piel.

11.3 Edema

Grado 0 -- Normal:

No se presenta líquido en los espacios intersticiales.

Grado 1 -- Presencia:

Acumulación de líquido en los espacios intersticiales.

1.2.10. Resultados

1.2.10.1 Cálculo del índice de irritación primaria

-- Cálculo del índice de irritación primaria para productos que no alteran el color de la piel.

-- Obtener una media aritmética de las siguientes observaciones:

-- Edema de piel íntegra 24 horas.

-- Edema de piel escoriada 24 horas.

-- Eritema de piel íntegra 24 horas.

-- Eritema de piel escoriada 24 horas.

-- Edema de piel íntegra 72 horas.

-- Edema de piel escoriada 72 horas.

-- Eritema de piel íntegra 72 horas.

-- Eritema de piel escoriada 72 horas.

-- Obtener las sumatorias de estas 8 (ocho) medias aritméticas y dividir las por 4 (cuatro). El valor encontrado es el índice de irritación primaria cutánea del producto.

-- Cálculo del índice de irritación primaria cutánea para productos que alteran el color de la piel.

-- Congestión en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 24 horas.

-- Inflamación en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 24 horas.

-- Edema en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 24 horas.

-- Congestión en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 72 horas.

-- Inflamación en piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 72 horas.

-- Edema en piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 72 horas.

Obtener la sumatoria de las 6 (seis) medias aritméticas y dividir las por 3.

El valor encontrado es el índice de irritación primaria cutánea del producto.

1.2.10.2 Clasificación de irritante cutáneo primario

Clasificación de irritante primario cutáneo para productos que no alteran el color de la piel.

De acuerdo con el índice de irritación cutánea primaria obtenido, el producto puede ser clasificado en:

Valor del índice	Clasificación
0 - 0.9	No irritante
1 - 1.9	Ligeramente irritante
2 - 4.9	Moderadamente irritante
Mayor de 5	Severamente irritante

Clasificación de irritante cutáneo primario para productos que alteran el color de la piel.

De acuerdo con el índice de irritación primaria obtenido el producto puede ser clasificado en:

Valor del índice	Clasificación
0 - 0,59	No irritante
0,6 - 0,9	Ligeramente irritante
1,0 - 1,3	Moderadamente irritante
Mayor de 1,3	Severamente irritante

Observaciones

En el caso que de pruebas realizadas con animales que fueron utilizados anteriormente en pruebas de irritación cutánea, no será válido el resultado positivo (producto irritante), debiendo ser repetida la prueba.

Criterio de animal positivo.

El animal será considerado positivo cuando presente una o más reacciones positivas citadas más adelante en cualquier período de la prueba.

Las reacciones cutáneas son clasificadas dentro de un criterio positivo o negativo según:

Reacción negativa	Reacción positiva
Eritema 0 - 1	Mayor de 2
Edema 0	Mayor de 1

1.2.10.3. Criterio de producto satisfactorio

-- Productos que no alteran el color de la piel.

-- Un producto probado es considerado como satisfactorio si su índice de irritación cutánea estuviera comprendido entre 0 (cero) y 0.9.

-- Productos que alteran el color de la piel.

-- Un producto testado es considerado como satisfactorio si su índice de irritación cutánea estuviera comprendido entre 0 (cero) y 0.59.

1.2.10.4. Duración de la prueba

5 días.

1.2.10.5. Referencias bibliográficas

1. Draiz J. H. (1965) Dermal Toxicity Appraisal of the Safe Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics. pp. 46-59, The Association of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas.

2. Draize, J. H., Woodard, G., Calvery, H. O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 83, 377-390.

2. Irritación cutánea acumulativa

2.1 Objetivo

La presente técnica presenta un análisis del potencial de irritación cutánea después de la aplicación repetida de la sustancia a ser ensayada.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Equipamientos

Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.1, para el ensayo de irritación primaria cutánea.

2.2.2. Soluciones

Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.2. para el ensayo de irritación primaria cutánea.

2.2.3. Animales

Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.3. para ensayo de irritación primaria cutánea.

2.2.4 Selección de los animales

Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.4 para el ensayo de irritación primaria cutánea.

2.2.5. Preparación de los animales

Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.5. para el ensayo de "irritación primaria cutánea".

2.2.6. Preparación de la muestra

Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.6. para el ensayo de irritación primaria cutánea.

2.2.7. Aplicación del producto

Seguir con lo descrito en el ítem 1.1.7 del ensayo de irritación primaria cutánea.

Aplicar el producto sobre las dos áreas peladas previamente (áreas 1 y 2 - fig. 1) en tanto que, las 2 áreas inferiores (áreas 3 y 4 - fig. 1) servirán como controles.

La aplicación del producto debería ser hecha durante 10 días consecutivos. Durante ese período el escarificado de las áreas peladas debe ser alternado y el rasurado de los animales debe ser hecho todos los viernes.

2.2.8. Colocación del parche oclusivo.

Seguir conforme a lo descrito en el ítem 1.2.8. para Irritación primaria cutánea para cada día de aplicación.

2.2.9. Lectura y graduación de las reacciones cutáneas.

Las lecturas deberán ser hechas 24 a 72 horas después de la última aplicación siguiendo las tablas de graduación de las lesiones descritas en los ítem 1.2.9 y 1.2.10 para irritación primaria cutánea.

2.3. Bibliografía

-- Draize J. H. Dermal Toxicity Food Drug Cosmetic Law Journal 10: 722 -(1955).

-- Somers, G. F. Testing drugs for Dermal Toxicity, J. Soc. Cosmetic Chemists 15: 384-404- (1964).

-- Protocolo de irritacao primaria cutánea. Departamento de Farmacología e Toxicología - INCQSIFIOCRUZ.

-- Protocolo de Irritación Primaria cutánea. Departamento de Farmacología del INFy B.

3. Sensibilización por aplicación tópica

Estudio preliminar

Este test no debe ser realizado si existen alteraciones de la piel en el test de Irritación Primaria Dérmica.

3.1. Objetivo

La presente técnica evalúa el potencial de sensibilización de los materiales en estudio.

3.2. Materiales y reactivos:

3.2.1. Materiales

Parches de 6 cm² de las materias primas a utilizar y de producto terminado en el ensayo embebidos en solución fisiológica a saturación.

-- Solución fisiológica estéril.

--Vehículo oleoso: Adyuvante completo de Freund (F.C.A.)

-- Agujas hipodérmicas.

-- Gasa estéril

-- Plástico adhesivo impermeable.

-- Cinta adhesiva hipoalergénica.

-- Esparadrapo.

3.2.2. Soluciones

-- Solución isotónica de cloruro de sodio estéril.

-- Adyuvante de Freund completo diluido al 50 % con solución Isotónica de Cloruro de Sodio estéril y homogenizado.

3.2.3. Animales

20 cobayos albinos (10 hembras y 10 machos, peso al comienzo de la experiencia 300-400 grs.).

La mitad de los cuales serán destinados a control.

3.3. Ejecución del ensayo

3.3.1. Fase de inducción

3.3.1.1. Preparación de la solución a inyectar al grupo tratado y al grupo control:

0,1 ml de adyuvante de Freund completo (FCA) diluido al 50 % en solución salina isotónica estéril.

3.3.1.2. Rasurar la región dorsal de los cobayos en una superficie de alrededor de 9 cm²

3.3.1.3. Aplicación tópica de la sustancia usando los parches oclusivos y dos inyecciones intradérmicas del adyuvante de Freund completo diluido.

Para el grupo control se realiza el mismo procedimiento, pero en lugar de aplicar la materia prima embebida en solución fisiológica estéril, se aplicará en 10 animales gasa embebida en solución fisiológica estéril.

El día lunes de cada semana se rasura la región a tratar, el día 1 y 10 los cobayos reciben una inyección intradérmica de adyuvante de Freund completo diluido, los dos sitios de la inyección deben estar tan cerca como sea posible del área aplicada.

La sustancia de prueba se aplica tres veces por semana con 2 días de intervalo durante 3 semanas y una al

comienzo de la 4ª semana.

El sitio de aplicación debe ser justo encima del sitio de inyección.

El parche se retira cada 48 horas.

El último parche (décimo) se retira el día 24, luego de 48 horas de contacto con la piel.

3.3.1.4. Suspensión del tratamiento

El tratamiento es suspendido desde el día 24 al 35 inclusive (por un período de 12 días). Este es el tiempo necesario para que el organismo produzca la respuesta inmunológica.

3.3.2. Fase desencadenante

El día 36 los cobayos son rasurados, en la región del abdomen (flanco izquierdo): sin tratamiento previo, se coloca un parche oclusivo con la sustancia de prueba y se deja durante 48 horas el día 38 se retira.

3.4. Evaluación

Las lecturas se realizan en el sitio desencadenante a las 1, 6, 24 y 48 horas luego de retirado el parche oclusivo, de acuerdo con la escala descrita en el ensayo de irritación dérmica primaria.

Debe realizarse examen histológico de la piel cuando denota una lesión en forma macroscópica o cuando la reacción sea dudosa.

3.4.1. Expresión de resultados

El examen macroscópico e histológico debe ser realizado en forma ciega.

El resultado es positivo cuando uno o más animales muestran una reacción macroscópica confirmada histológicamente como reacción de sensibilización.

El resultado es negativo cuando ningún animal muestra evidencia de reacción macroscópica.

El resultado es dudoso cuando hay evidencia de reacción macroscópica no confirmada histológicamente.

Los absorbentes descartables y sus materiales constitutivos deben dar negativo el test de sensibilización.

3.5. Referencia bibliográfica

Método de Magnussen y Kligman modificado según J.M. Faccini y J.P. Guillot. *Animals and alternatives in toxicity* Academic Press 1983.

4. Ensayo de citotoxicidad "in vitro"

4.1. Instrumental y reactivos

a) Estufa a 37° C.

b) Cámara Húmeda conteniendo CO₂ al 5 %.

c) Microscopio con Faz invertida.

d) Célula ATCC, CCLI, NCTCy CLON 929 de Fibroblastos de ratón u otras líneas celulares sensibles al ensayo.

e) Agar.

f) Colorante vital: Rojo neutro.

g) Medio de cultivo: EAGLE (M.E.M.), pH = 7.3

h) Frasco de cultivo de plástico neutro de 25 cm².

i) Placas de Petri.

j) Pipetas

k) PBS- Solución Tampón de Fosfato (pH = NEUTRO)

l) Pinza Estéril

4.2 Tamaño de la muestra

1 cm² o 100 mg de peso.

4.2.1. Ejecución del ensayo

Colocar el cultivo de células en cámara húmeda con CO₂ al 5 %, inoculando 5 ml de una suspensión celular, con una concentración de 130 x 10³ ml, en medio EAGLE e incubar a 37° C por 48 horas.

4.2.2. Descartar el medio, con pipeta estéril y enseguida lavar con solución Tampón de Fosfato.

4.2.3. Adicionar 4 ml de AGAR precalentado en placa de Petri con colorante vital.

4.2.4. Colocar la muestra con pinza estéril sobre la zona central, de la placa e incubar nuevamente a 37° C.

4.2.5. Retirar la muestra, después de 24 horas y anotar o marcar, el área de inhibición.

4.2.6. Observar al microscopio de faz invertida.

4.2.7. Resultados: observar el índice de Zona (I.Z.), o sea el área no coloreada, y el índice de LISIS (I.L) que indica el porcentaje de células degeneradas.

Ambos índices, nos dan el índice de respuesta (I.R) conforme a la siguiente relación:

$$IR = IZ / IL$$

Tabla 8 - Índice de zona Lis

INDICE DE ZONA (L.Z.)	INDICE DE LISIS (I.L.)
0. Ninguna zona sobre o alrededor de la muestra.	0. Ninguna LISIS
1. Zona limitada sobre la muestra	1. Menos que 20 %
2. Zona no mayor que 0,2 cm	2. Menos que 40 %
3. Zona no mayor que 0,2 cm y menor que 1cm.	3. Menos que 60 %
4. Zona mayor entre 1-2 cm.	4. Menos que 80 %
5. Zona mayor que 2 cm.	5. Más que 80 %

4.3. El material en ensayo no debe presentar resultados distintos a los controles negativos.

5. Control microbiológico

5.1. Introducción

Las presentes técnicas microbiológicas tiene como objeto determinar los números de los microorganismos aerobios viales presentes en las muestras (bacterias, hongos y levaduras) así como también la ausencia o presencia de determinados géneros y especies bacterianos.

5.2. Capacidad nutritiva de los medios de cultivo:

Preparar cultivos en Caldo Caseína Soja de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P o 6538; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Escherichia coli* ATCC 8739; *Cándida albicans* ATCC 10331 o 3001. Incubar los tres primeros durante 18 - 24 horas a 30 - 35° C y el de *Cándida albicans* durante 48 horas a 20 - 25° C. Diluir cada cultivo en buffer fosfato pH 7,2 de modo de obtener 100 cél/ml y emplear el inóculo de los microorganismos separadamente como control de los medios de cultivo utilizados.

5.3. Materiales y equipos

1. Pipetas graduadas, estériles de 1 ml; 2ml; 10 ml; y 20 ml.
2. Erlenmeyers. Balones de vidrio y vasos de Precipitados estériles.
3. Placas de Petri de 20x100 mm estériles.
4. Varillas de vidrio estériles.
5. Tubos de ensayos de 20 x 200 mm estériles.
6. Paños de gasa estériles.
7. Instrumentos, pinzas, tijeras, bisturíes, hojas de bisturí, espátulas, estériles.
8. Balance con sensibilidad 0,01 g.
9. Estufas de incubación reguladas a 20°C, 25°C y a 30°C.
10. Sobres generadores de atmósfera anaeróbica, indicadores y jarras para anaerobiosis.
11. Sistema de vela para microaerófila o sobres generadores de atmósfera microaerófila.

5.4. Medios de cultivo y soluciones:

1. Caldo Sabouraud Dextrosa.
2. Caldo Caseína Soja
3. Caldo Lactosado
4. Caldo Tioglicolato 135 C (Tratado durante 10 min en baño de agua a 100°C y enfriado inmediatamente). Puede ser reemplazado por Caldo/Cerebro Corazón PreReducido o Por Caldo Carne Cocida.
5. Agar Papa Dextrosa o Agar Sabouraud Dextrosa.
6. Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (Agar SPS) de Angelotti
7. Agar Mac Conkey
8. Agar Manitol Salado o Agar Vogel-Johnson o Agar Baird Parker.
9. Agar Cetrimida
10. Agar Caseína Soja

11. Medios de Cultivo para Pruebas Bioquímicas de Identificación de S. aureus: E. coli; P. aeruginosa.

12. Buffer Fosfato pH 7,2

5.5. Reactivos

1. Tween 80

2. Alcohol Etilico 70°

3. Plasma de Conejo

4. Colorante para Gram

5. Reactivos para revelar las pruebas bioquímicas.

6. Solución de Clorhidrato de N-N-N-N- Tetrametil p- Fenilen Diamina al 0,5 % para prueba de oxidasa.

7. Parafina estéril

5.6. Manipulación de la muestra

Seguir las siguientes recomendaciones:

1. Analizar las muestras lo más pronto posible luego de su llegada al laboratorio. Si fuese necesario almacenarlas; hacerlo a temperatura ambiente.

2. Inspeccionarlas cuidadosamente antes de abrirlas verificando las irregularidades de sus envases.

3. Desinfectar cada paquete individual de muestra con una gasa estéril embebida en un desinfectante que no ataque el material de empaque.

4. Para cada análisis microbiológico, es preciso utilizar una porción representativa del contenido de la muestra, usar una porción de 10 g.

5. Si no hubiere necesidad de análisis múltiples, estudio microbiano, toxicología y química, la submuestra para el examen microbiológico deberá ser retirada en primer lugar.

5.7. Preparación de la muestra:

En la preparación de la muestra a ser probada, no deberá producirse alteración del número o tipo de microorganismos originalmente presentes.

La muestra deberá ser removida asépticamente, pesando 10 g en un vaso de precipitados estéril, para cada una de las pruebas descriptas.

Se puede utilizar un pequeño volumen de un agente emulsificante estéril, como dos polisorbatos 80 en la preparación de la suspensión.

5.8.1. Método de recuento en placa:

Diluir la suspensión, de modo de obtener un recuento entre 30 a 300 colonias, Pipetear 1 ml de cada dilución en placas de Petri en duplicado. Agregar 15 a 20 ml de agar caseína soja previamente fundido y enfriado aproximadamente a 40° C.

Mezclar la muestra con el medio de cultivo con movimientos rotatorios. Dejar solidificar el contenido a temperatura ambiente e incubar a 30-35° durante 48 a 72 horas. Si no se observan colonias microbianas en las placas de la dilución 1:10 en adelante, expresar los resultados como: menos de 10 u.f.c./g de Muestra.

5.9. Prueba para Staphylococcus Aureus y Pseudomonas Aeruginosa

Agregar a la muestra caldo de caseína soja hasta completar 100 ml Incubar a 30-35° de 24 a 48 hs. Si hubiera evidencia de crecimiento, sembrar con ansa en una placa de agar Vogel Johnson y en una placa de agar Cetrimida. Incubar las placas de 30-35°C durante 24 a 48 horas. Si al cabo del período de incubación no se observaran colonias sospechosas de Staphylococcus aureus la muestra satisface las exigencias de ausencias de estos microorganismos.

Cuadro II- Características morfológicas de Staphylococcus Aureus en medios selectivos.

Medio Selectivo	Agar Vogel-Johnson	Agar Manitol-Sal	Agar Baird-Parker
Mofologia Cultural Característica	Negra, con halo amarillo	Amarillo, con halo Amarillo	Negra, brillante con halo claro de 2 a 5 mm.
Coloración de Gram	Cocos Gram positivos en acúmulos		

5.9.1. Prueba de la coagulasa (Para Staphylococcus aureus)

Inocular pequeñas cantidades de crecimiento en agar inclinado en 0,2 ml de caldo BHI. Incubar por 18 a 24 hs., a 35 + 2°C. Agregar 0,5 ml, de coagulasa plasmática de conejo reconstituida (con EDTA) y homogeneizar. Incubar a 35° + 2°C y observar.

Las cepas que producen coagulasa francamente, pueden requerir una noche de incubación para que la formación del coágulo se torne evidente. Deberán utilizarse controles negativos y positivos. Si no fuera observado ningún grado de coagulación, la muestra satisface las exigencias de las pruebas para ausencia de *Staphylococcus aureus*.
Cuadro III - Características morfológicas - *Pseudomonas aeruginosa*

Medio	Agar Cetrimida	Agar para pseudomonas para detección de fluoresceína	Agar para pseudomonas para detección de Piocianina
Morfología Cultural Característica	Generalmente verdosa	Generalmente incolora a amarillenta	Generalmente verdosa
Fluoresceína Luz U.V.	Verdosa	Amarilla	Azul
Prueba de Oxidasa	Positivo	Positivo	Positivo
Coloración de Gram	Bacilos o cocos bacilos Gram negativos		

5.9.2. Prueba de oxidasa y de pigmentos para *pseudomonas aeruginosa*

A partir del agar cetrimida sembrar con anzar en los medios para dectar fluoresceína y Piocianina. Incubar a 35 + 2°C por un período de tiempo no inferior a 3 días. Examinar las estrías de crecimiento a la luz U.V. Observando las características descritas en el Cuadro III. Hacer la prueba de oxidasa con el crecimiento sospechoso. Si la prueba fuese negativa la muestra satisface las exigencias para ausencia de *Pseudomonas aeruginosa*.

Si es necesario para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* apiocianogénicas, serán necesarias otras pruebas para su identificación.

5.10 Prueba para *Escherichia coli*

Agregar a la muestra, caldo lactosado, de modo de obtener un volumen final de 100 ml Incubar a 30-35°C durante 24 a 48 horas.

Si hubiera evidencia de crecimiento, inocular una placa de agar Mac Conkey. Incubar a 30- 35°C durante 24 a 48 horas. Si se observa desarrollo de colonias sospechosas de *Escherichia coli*, sembrar una placa con agar Levine (Eosina-Azul de Metileno). Si no aparecen colonias con brillo metálico característico o color negro azulado la muestra satisface las exigencias para ausencia de *Escherichia coli*. Su presencia podrá ser confirmada por pruebas bioquímicas adicionales.

5.11 Investigación de clostridios

Transferir 50 ml de preparación de muestra para 90 ml de caldo tioglicolato 135 C o caldo BHI con extracto de levaduras prerreducido o caldo carne cocida. Incubar a 30-35°C durante 48 horas en ambiente anaerobio (excepto el BHI prerreducido). A partir de los caldos en que se observase crecimiento sembrar en placas de agar para anaerobios, incubar a 35°C durante 48 horas en ambiente anaerobio. Aislar las colonias sospechosas en tubos con BHI prerreducido o con los otros caldos. Incubar de la misma forma que antes. En los caldos que hubiera crecimiento llevar a cabo las siguientes pruebas:

1. Coloración de Gram (bacilos gram positivos con morfología compatible con el género *Clostridium*)
2. Tipo respiratorio.
3. Termorresistencia.

El tipo respiratorio se determina sembrando el crecimiento de cada tubo en 3 placas conteniendo agar para anaerobios.

Incubar una placa en anaerobiosis en las condiciones ya descritas. Otra placa en microaerofilia y la restante en aerobiosis en las condiciones de temperatura y tiempo ya descritas.

Se probará la termorresistencia sembrando 0.1 ml del crecimiento en los tubos de BHI prerreducido o caldo tioglicolato 135 C caldo carne cocida y calentado a 80°C durante 15 min.

Enseguida incubarlos en las condiciones ya descritas. Paralelamente, incubar un control positivo no sometido a la prueba de resistencia.

Al cabo del período de incubación, observar el crecimiento de cada placa incubada a las diferentes condiciones y determinar o no presencia de microorganismos anaerobios en el producto. Si es positivo proceder a la coloración de gram y a la prueba de catalasa. Hacer lo mismo con los tubos sometidos a la prueba de termorresistencia. Si hubiera evidencia de crecimiento, investigar la presencia de esporos por el método de coloración de Gram.

5.12 Investigación de *Clostridium sulfito reductores* en 5 g de muestra.

Se siembran 50 ml de la dilución 1:10 de la muestra en 50 ml de caldo tioglicolato doble concentración adicionado de N3 Na 0,02 %, previamente calentado a 100°C durante 10 min. y enfriado. Se cubre con parafina estéril y se incuba durante 48 horas a 35°C. Se colocan porciones de 0,1 ml de este cultivo en tubos estériles. Luego se cubre con Agar fundido y enfriado a 40°C. Se cubre con parafina y se incuba durante no menos de 3 días a 37°C. El desarrollo de colonias negras indica que la prueba es positiva.

Referencias bibliográficas

1. Microbiological Test - Microbial Limit Tests - USP XXI.
2. Manual análisis Microbiológicos de cosméticos de INCOS -fiocruz aerosol o cosméticos - Jan/Fav 89
3. Farmacopeia Brasileira - 4ª ed.

