



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DEL METODO ANALITICO POR TOC
"TOTAL ORGANIC CARBON" PARA SU APLICACION
COMO METODO DE ANALISIS DE LIMPIEZAS DE LAS
AREAS PRODUCTIVAS EN UNA PLANTA
FARMACEUTICA

294720

TRABAJO DE TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MYRNA FABIOLA ARREDONDO TREVIÑO





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado asignado:

Presidente Prof. María del Socorro Alpizar Ramos

Vocal Prof. Juan Manuel Peguero Zambrano

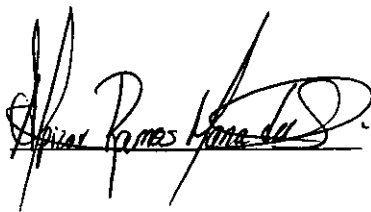
Secretario Prof. Liliana Aguilar Contreras

1er. Suplente Prof. Ernestina Hernández García

2º. Suplente Prof. María Josefa Bernad Bernad

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Facultad de Química.

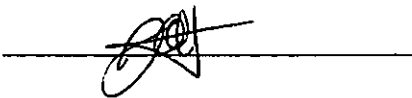
Asesor del tema: Q.F.B. María del Socorro Alpizar Ramos



Supervisor técnico: Q.F.B. Ana Esther Robert Guadalajara



Sustentante: Myrna Fabiola Arredondo Treviño



AGRADECIMIENTOS

A ti papá (dondequiera que estés):

Gracias papito, por haberme reconfortado en tus brazos cuando tenía miedo de niña y por darme paz con tu voz.

También, gracias por haber sido mi maestro y por todo lo que te aprendí.

Gracias por decirme mil veces que modulara mi carácter y que siempre tuviera valor en todas las decisiones de mi vida.

Gracias por los hermosos recuerdos de mi infancia

y tu amor y comprensión en mi adolescencia.

Gracias por haber sido siempre mi amigo antes que juez;

por nunca haber denotado dureza en tu rostro en ningún momento;

por escucharme y orientarme antes que reprenderme;

por haber estado conmigo en todos los trances duros, salvo el último, cuando partiste.

Mil gracias papito, por todo el amor, la compasión, la humildad, la ética

y la fortaleza que me inculcaste,

por ayudarme a caminar por la vida

y superar los tropiezos siempre con la frente en alto.

Gracias por darme el enorme orgullo de ser llamada "tu hija",

pero sobretudo, gracias por demostrar el orgullo que sentías por mí.

Gracias por siempre perdonarme y hacerme sentir mejor cuando cometí algún error

y por desbordar alegría y emoción cuando triunfé.

Gracias por siempre darme lo mejor de ti, pero sobretudo,

gracias a Dios, por que de todos los padres del mundo,

me dio al mejor: Tú.

Gracias por haber sido el mejor papá y por compartir este sueño de los dos

aunque ya no estés aquí.

Gracias papito

A mi mamá:

Por todos tus desvelos y preocupación
Por tus palabras de aliento cuando algo no marchaba bien
Por tu apoyo y cariño en todo momento

Por ser mi principal ejemplo de coraje y valentía
Por enseñarme a tomar mis propias decisiones
Por ayudarme a ser mejor en todos los aspectos

Por que siempre has estado ahí
Y me has brindado siempre una sonrisa cuando hacía falta
Por haberme abrazado cuando podía derrumbarme

Por haberme enseñado a andar mi propio camino
Por el orgullo que me demuestras
Por la confianza que siempre has depositado en mí

Gracias mamá

Gracias por ayudarme a realizar este sueño y compartirlo conmigo.

Te quiero mucho mamá.

A Armida:

Las grandes amistades terminan en hermandad

Nunca se olvidan los momentos de risa que te inflaman el alma y los momentos de llanto que templan el carácter; pero son mejores cuando los vives con tu hermana de alma. Gracias por todo tu cariño, tu apoyo, tus palabras de aliento y tu alegría.

Gracias por tu inagotable paciencia y disposición. Gracias por haber estado ahí en los mejores y en los peores momentos de mi vida.

Tú formas parte de este triunfo por que eres una parte muy importante de mi vida.

Gracias hermanita.

A mi tía Hilde y mi tío Raúl:

Gracias por siempre creer en mí y haberme dado incondicionalmente su cariño y apoyo.
Gracias por haber formado una parte tan importante en mi niñez y por seguirlo siendo ahora.
Gracias por su infinito amor y cariño y por siempre tener las palabras correctas en el momento preciso.

Gracias por recordar conmigo a los que ya no están y por compartir este sueño conmigo.

Gracias por brindarme siempre una mano en los momentos más duros de mi vida y ayudarme a mejorarlos al recordar con cariño a aquellos que se fueron antes que nosotros.

Gracias, por que ustedes son parte de la realización de todos mis sueños.

Los quiero mucho.

A mi abuelita:

Que aunque ya no esté aquí, sé que en algún lugar lleno de luz; estará feliz de haber sido parte de mi formación y haber dejado la huella que me dejó.
Gracias por todo lo que me enseñaste y por tu gran amor.

A mi hermana:

Gracias por haber sido tal como eres y por ser un ejemplo de entereza y sensatez.
Gracias por confiar en mí y demostrarme en tu muy particular forma tu cariño y orgullo.

Gracias por siempre estar ahí y escucharme
Gracias por tu apoyo y tu paciencia
Gracias por que siempre puedo encontrar en ti a la mejor de las amigas.

Gracias Jana

A Edgar:

Gracias por haber aparecido de esa manera tan maravillosa en mi vida y por hacerme parte de la tuya.
Gracias por el inmenso amor que despertaste en mí y por recordarme la importancia de poder mirar a los ojos a la vida y retarla por mejores momentos.

Gracias por hacerme tan feliz amor.

Te amo.

A mis primos y tíos:

Por toda su confianza y cariño y por formar parte importante de mí.

A mis compañeros de trabajo por ayudarme a ser parte de un este equipo maravilloso.

A la maestra Socorro:

Por todo el apoyo y cariño que me ha brindado en la realización de este trabajo.

A Anita:

Por enseñarme a siempre tratar de ser la mejor en todo lo que haga, pero sobretodo por brindarme su amistad, cariño y apoyo.

Gracias Anew.

Gracias a todas aquellas personas que sin saberlo han formado parte de mi vida y la han mejorado en algún aspecto.

Gracias a Dios por haberme puesto en el lugar en que me puso y por darme la oportunidad de reconocer lo maravilloso que se vé el cielo, aún cuando no haya estrellas.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC "TOTAL ORGANIC CARBON" PARA SU APLICACIÓN COMO MÉTODO DE ANÁLISIS DE LIMPIEZAS DE LAS ÁREAS PRODUCTIVAS EN UNA PLANTA FARMACÉUTICA

CAPÍTULO I

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES.

- Calificar el analizador de Carbón Orgánico Total (TOC).
- Desarrollar y validar el método analítico de análisis por TOC, para su posterior aplicación en la validación de limpiezas de las áreas productivas de la Industria Farmacéutica.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.1 Calificar la Instalación, Operación y Funcionamiento del equipo analizador de TOC Modelo 800.
- 1.2 Desarrollar y Validar el Método Analítico por TOC, demostrando su Linearidad, Precisión, Exactitud y Repetibilidad, así como la Adecuabilidad, Precisión, Linearidad, Límite de Detección y Límite de Cuantificación del instrumento.
- 1.3 Desarrollar la técnica de muestreo por hisopo y último enjuague, determinación de blancos y análisis estadístico de los datos obtenidos, para su aplicación directa en la validación del análisis de los métodos de limpieza de las áreas productivas de la Industria Farmacéutica.

CAPÍTULO II.

INTRODUCCIÓN

VALIDACIÓN

La validación en un principio, se estableció en la industria farmacéutica para asegurar la esterilidad de productos parenterales y otros productos estériles. Básicamente, el sistema implicaba la colocación de sensores o instrumentos de medición en todos los puntos críticos dentro de los equipos de esterilización, para obtener de manera exacta, la temperatura y otras condiciones que influyen en el logro de la esterilidad, para después de un ciclo de esterilización de un producto en particular, en un contenedor en particular, bajo completas condiciones de fabricación; el examen del historial de las condiciones de esterilización, asegure absolutamente que la esterilización se logró con cada una de las unidades de los productos procesados de esa manera.

Actualmente, los conceptos de validación se han reconocido por su valor para asegurar las características de calidad de los diferentes productos farmacéuticos.

Actualmente la FDA (Food and Drug Administration) afirma: *"Un proceso validado de manufactura, es aquel que ha probado hacer aquello que se supone que debe hacer".*

Las evidencias de validación, se obtienen a través de datos del proceso durante la fase de desarrollo y continuamente a través de la fase de producción.

El término Validación, se refiere a la demostración de que un proceso se comporta de manera consistente; que permitirá obtener resultados similares de manera consistente en cualquier momento; es decir: *Establece la evidencia documental que provee un alto grado de aseguramiento de que un proceso específico, consistentemente producirá productos que cumplen con las especificaciones establecidas y con sus atributos de calidad.*

INTRODUCCIÓN A LA VALIDACIÓN

Para poder lanzar al mercado un medicamento, se requiere una licencia otorgada por parte de las autoridades regulatorias; en el Reino Unido, la Agencia de Control de Medicinas (Medicines Control Agency); en Estados Unidos la FDA (Food and Drug Administration); en Europa, la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (EMA) y en México la Secretaría de Salud (SSA). La licencia se obtiene, solamente después de una muy estricta y exitosa inspección de las instalaciones del solicitante de la licencia.

Para demostrar el cumplimiento con los lineamientos regulatorios, una compañía debe proporcionar los documentos exactos y específicos que demuestran que todos los procesos, sistemas ambientales, equipos de producción y todo aquello relacionado con la manufactura de medicamentos, confiablemente cumplen con las demandas esperadas de ellos. Estas demandas deben ser las adecuadas para cada sistema.

La validación puede costar millones de dólares. Sin una validación exitosa, a una compañía no se le permitirá producir medicamentos y eventualmente caerá en quiebra.

Con una validación exitosa, una compañía producirá sus productos de manera eficiente y seguramente prosperará en el mercado; luego entonces, es muy importante hacerlo bien desde la primera vez. Con la validación, una compañía se asegura que sus procesos, siempre se encuentren bajo control.

Categorías de Validación

Existen varias disciplinas dentro de la validación que evolucionaron para lograr cumplir con las Buenas Prácticas de Fabricación actuales. Cada disciplina involucra individuos y prácticas establecidas para cada uno de los ámbitos profesionales que abarcan las buenas prácticas de manufactura.

Las cinco categorías de validación establecidas son las siguientes:

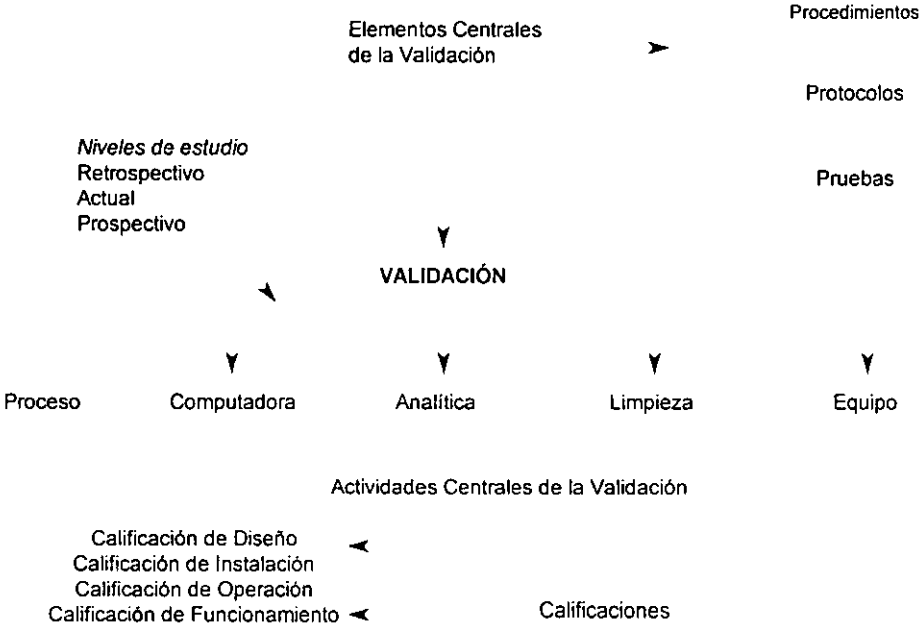
- *Validación de Procesos
- *Calificación de Equipos
- *Validación de Sistemas Computacionales
- *Validación Analítica
- *Validación de Limpieza

A pesar de que cada categoría tiene sus propios límites, pero se pueden traslapar una con otra y apoyarse mutuamente.

El proceso completo de la validación se compone de varias etapas, cada una de ellas conocida como calificación. Las etapas siguen un patrón lógico desde la planeación de un proyecto hasta su desarrollo experimental.

El siguiente diagrama de flujo, muestra las actividades centrales por categorías y cada una de las etapas, a desarrollar durante la validación.

Diagrama 1. Actividades Centrales de Validación.



El plan maestro de validación contiene cuatro etapas:

1. Calificación de Diseño (DQ)
2. Calificación de Instalación (IQ)
3. Calificación de Operación (OQ)
4. Calificación de Funcionamiento (PQ)

Cada calificación se prepara prospectivamente a partir de un protocolo de calificación, el cual deberá:

- *Llevar título
- *Describir el propósito de la calificación
- *Describir con exactitud el área, equipo, sistema o instalaciones que cubre
- *Referencia cruzada con información relevante con número de identificación (Órdenes de compra, Especificaciones, Planos, etc.)

- *Describir las partes críticas del equipo (materiales de construcción, pruebas de presión etc.)
- *Lista de factores externos como conexiones a servicios o a una parte de maquinaria
- *Lista de accesorios de seguridad
- *Describir cualquier modificación a partes de equipo
- *Describir el trabajo requerido para probar el criterio de aceptación establecido para el equipo
- *Confirmar que el procedimiento para el control de cambios se encuentra vigente
- *Referenciar los Procedimientos Estándar de Operación requeridos y
- *Describir el mantenimiento llevado a cabo tanto para emergencias como preventivo y el propuesto para ser llevado a cabo

La validación tiene un ciclo de vida. Debe iniciar en alguna parte, desarrollarse y progresar a través de caminos sistemáticos. Debe terminar cuando su objetivo se ha vuelto obsoleto. El ciclo inicia cuando un individuo o grupo de individuos deciden manufacturar un medicamento o producto farmacéutico; entonces describirán con precisión la forma que tomará el medicamento y la enfermedad o condición que está dirigido a tratar. Esta descripción se deberá tener por escrito y se conoce como "Especificación de Requerimientos del Usuario".

Un proceso se considera validado, siempre y cuando el diseño, la instalación, la operación y funcionamiento del equipo involucrado, se encuentran calificados. En la industria farmacéutica, un proceso de fabricación se valida al menos con los tres primeros lotes consecutivos del mismo producto, además de la calificación del equipo descrita arriba.

Así como se valida un método analítico demostrando con resultados experimentales la linealidad, la precisión, la exactitud, el límite de detección y cuantificación; en un equipo analítico se califican el Diseño, la Instalación, la Operación y el Funcionamiento. Una vez concluida esta fase de calificación, se continúa con la demostración de la Linealidad, Precisión, Exactitud, Límite de Detección y Cuantificación del instrumento para finalmente demostrar la Precisión y Exactitud del método analítico.

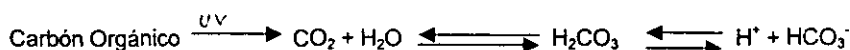
Análisis de Carbón Orgánico Total (TOC)

En Junio 11 de 1996, el Subcomité de Agua y Parenterales y la Convención de la USP, votaron para cambiar las viejas monografías para el agua. Estos cambios especificaron tanto las características de la calidad del agua como los métodos analíticos. Llegaron a la conclusión de que el Carbono Orgánico Total (TOC) es un sustituto de la prueba química húmeda de *Sustancias Oxidables*. En Mayo de 1998 se implementó la prueba de TOC como requerimiento del agua para inyectables y agua purificada y apareció publicado en el Octavo Suplemento de la USP 23.

Carbono Orgánico Total (TOC)¹, es una medición indirecta de las moléculas orgánicas presentes en agua farmacéutica, determinadas como carbón. Sin importar las tecnologías, éstas deben compartir el principio de TOC; que es oxidar completamente las moléculas orgánicas hasta bióxido de carbono.

Principal mecanismo de reacción:

¹ 5º Suplemento de la USP 23-NF 18. Capítulo <643>.



La solución estándar, es una solución teóricamente fácil de oxidar, que le da al instrumento una respuesta en el límite atribuido. Es una prueba cuantitativa, específica para carbono, sensible, exacta y automatizada.

La técnica analítica se califica retando la capacidad del instrumento, utilizando una solución teóricamente difícil de oxidar.

Las diferentes tecnologías analíticas utilizadas para medir TOC, comparten el objetivo de oxidar completamente la materia orgánica en una muestra, hasta CO_2 ; midiendo sus niveles y expresando la cantidad en concentración de carbono. Todas las técnicas analíticas, deben discriminar entre el carbono inorgánico y el orgánico, es decir, entre el CO_2 y bicarbonato disueltos y el CO_2 generado por la oxidación de moléculas orgánicas en la muestra. Existen dos enfoques generales para medir el TOC; uno lo determina restando el Carbono Inorgánico (IC) del Carbono Total medido (TC), el que a su vez es la suma del Carbono Orgánico (OC) y el IC:

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

En el otro enfoque, primero se purga el IC de la muestra antes de que se realice cualquier medida de carbón. Sin embargo, en este paso también se purga algo del carbono orgánico que puede ser reatrapado, oxidado hasta CO_2 y cuantificado como Carbono Orgánico Purgable (POC). La materia orgánica remanente en la muestra también es oxidada hasta CO_2 y cuantificada como Carbono Orgánico No Purgable (NPOC); de esta manera, el TOC es la suma del POC y el NPOC:

$$\text{TOC} = \text{POC} + \text{NPOC}$$

En aguas farmacéuticas, la cantidad de POC es insignificante y puede ser descartado. Entonces para propósitos de metodología, NPOC es equivalente a TOC.

Como requerimiento, el instrumento debe estar calibrado y su adecuabilidad debe ser periódicamente demostrada, además de tener un límite de detección establecido por el fabricante, de 0.05 mg de carbón por litro, (0.05 ppm) o menor. Como estándares, la USP establece la USP 1,4-Benzoquinona RS y la USP Sucrosa RS. Como agua reactivo se debe utilizar agua de alta pureza y en adición tener un nivel de TOC no mayor a 0.25 mg por litro (25 ppm). Todo el material de vidrio debe ser limpiado de cualquier materia orgánica y enjuagado finalmente con el agua de alta pureza para prevenir cualquier incremento en los niveles de TOC al realizar una lectura.

El capítulo <643> de la USP ² describe el enfoque de medida racional y los parámetros para la prueba TOC. Esta prueba se emplea de manera rutinaria en un gran número de industrias, incluyendo las de manufactura de semiconductores, generación de energía eléctrica y producción de agua municipal. En consecuencia, hay un gran número de instrumentos TOC disponibles en el mercado para considerar la prueba USP de TOC. A pesar de que la USP no especifica la metodología analítica, sí sugiere que tales instrumentos compartan el objetivo común de "oxidar completamente las moléculas orgánicas a bióxido de carbono".

² Implementing TOC testing for USP 23 - A Case Study. Lisa McCurdy. Pharmaceutical Engineering.

Se debe considerar un punto importante, que es el rango analítico del instrumento. Existen diversos instrumentos diseñados para concentraciones de TOC mucho mayores que las que existen típicamente en una toma de agua USP. Obviamente, tales instrumentos no poseen la sensibilidad adecuada para aplicarse en la prueba USP de TOC, por lo tanto, para fines farmacéuticos se deben utilizar aquellos aparatos que estén diseñados para medir las concentraciones consideradas en la USP 23.

La calibración del instrumento TOC es un tema importante que no se trata de manera específica en el capítulo mencionado anteriormente de la USP; simplemente menciona que se debe utilizar un "instrumento calibrado", implicando el uso del procedimiento de calibración del fabricante y la frecuencia de calibración indicada por el mismo; resultando en una variación en la frecuencia de calibración desde una al día, hasta una al año. Es importante el entendimiento de la calibración para calcular costos y asegurar que los métodos analíticos utilizados sean adecuados. Algunos instrumentos tienen que ser llevados con el fabricante para calibración, mientras que otros pueden ser calibrados por el personal del laboratorio.

También expone el uso, ya sea en línea o fuera de línea del instrumento TOC, siempre que las muestras medidas sean indicativas de la calidad del agua en los puntos de uso. El término *fuera de línea* se refiere a los instrumentos tradicionalmente en un laboratorio, donde las muestras colectadas son aplicadas al instrumento en un ambiente de laboratorio. Con instrumentos en línea, el aparato se coloca *in situ* con el sistema de agua, produciendo una salida continua de concentración de TOC. El hecho de que el instrumento se encuentre conectado en línea, proporciona varias ventajas:

1. Elimina el muestreo, el uso de material de vidrio que tiene que ser limpiado y mantenido; además, previene la contaminación de las muestras
2. Los datos continuos producidos por un instrumento en línea, pueden proporcionar una manera de profundizar en el comportamiento del sistema de agua.
3. También hay un aspecto proactivo del monitoreo con un instrumento en línea que no puede ser logrado con las pruebas diarias o semanales de un laboratorio. La naturaleza continua del flujo de datos, ayuda a establecer una línea base o un "estado estacionario" de un sistema de agua.

El capítulo <643> de la USP es muy específico acerca del método utilizado para calificar la adecuabilidad del método TOC elegido. El enfoque general involucra el establecimiento de la respuesta del instrumento a dos soluciones que teóricamente representan el rango de sustancias "fáciles" y "difíciles" de oxidar. Asimismo se establece la relación entre la respuesta del aparato a dichas soluciones y la eficiencia de respuesta del aparato:

$$\text{Eficiencia de respuesta} = 100 [(r_{ss} - r_w) / (r_s - r_w)]$$

Donde:

r_{ss} = respuesta del instrumento a 500 ppb del estándar de 1,4-Benzoquinona

r_s = respuesta del instrumento a 500 ppb del estándar de sacarosa

r_w = respuesta del instrumento al agua reactiva usada para preparar los estándares

temperatura para cada una de las variables, las ecuaciones se resuelven para $[H]$ y $[CO_2]$; entonces para un canal dado:

$$[C] = A \cdot [CO_2]$$

donde $[C]$ es la concentración de carbono en la muestra del canal en particular, y A es el factor de calibración para el canal en particular. El factor considera la desviación del recobro en el canal, del equilibrio ideal. La concentración de carbono es corregida para la medida de cero y el TOC se calcula como:

$$TOC = [C]_{TC} - [C]_{IC} - TC_0$$

Donde TC_0 es la compensación medida entre los canales con una muestra de agua deionizada y sin luz UV, y $[C]_{TC}$ y $[C]_{IC}$ son las concentraciones de carbono en el canal TC e IC respectivamente.

Utilizando este juego de ecuaciones, el TOC mod. 800 tiene una respuesta lineal del TOC calculado con el carbono presente en la muestra. Para verificar los cálculos, se puede simular la celda de conductividad y el termostato para cada canal, reemplazándolos con resistores de valores conocidos. A partir de los valores de resistencia es posible calcular los valores de temperatura y conductividad y se comparan entonces con los valores reportados por el instrumento.

No existe una desviación significativa, entre los valores del canal de respuesta reportados por el instrumento y los valores calculados de manera externa al instrumento. Dentro de la variación esperada en las mediciones, los valores obtenidos con el instrumento de prueba, concordaron con los valores esperados.

La desviación máxima entre la conductividad reportada y los valores esperados fue de 0.01% y la desviación máxima entre los valores reportados de temperatura y los esperados fue de 0.009%. Se demostró así, que dadas las mediciones de temperatura y conductividad, el cálculo de la concentración de carbono se llevó a cabo de manera correcta.

El modelo de TOC que utilizaremos (800), posee una ventaja adicional, utiliza el método de detección de Conductividad/Membrana, que a diferencia del método de Conductividad Directa, reconoce que existen diferentes tipos de especies iónicas producidas a partir de varios compuestos orgánicos y toma las medidas necesarias para excluir aquellas que podrían interferir con las lecturas de conductividad a través del uso de la tecnología de membrana. El método de Conductividad/Membrana es eficiente, exacto y económico.

Existen numerosos compuestos que producen intermediarios iónicos, que pueden perjudicar los resultados del TOC en mil por ciento o más, a menos que sean excluidos de las mediciones de conductividad. Las especies orgánicas que producen ácidos fuertes durante la oxidación son las más "peligrosas".

La inexactitud del método de Conductividad Directa ocasionada por la presencia de especies iónicas no deseadas, se puede calcular con los valores de conductividad específica de los iones.

La siguiente tabla muestra el por ciento de error en la lectura de conductividad con el método Directo:

Tabla 5.- Error calculado en mediciones del TOC.

	TOC reportado (ppm)	TOC calculado (ppm)	% ERROR
Cloruro de metileno	10	108	1.700
Cloroformo	10	475	4.650
Diclorodibromometano	10	223	2.130
Clorodibromometano	10	248	2.380
Bromoformo	10	302	2.290

CAPÍTULO III

VALIDACIÓN DE PROCESOS DE LIMPIEZA

La limpieza puede ser manual, semiautomatizada o automatizada, siendo en el primer caso dependiente del operador que la lleve a cabo, por lo tanto los procedimientos deben ser claramente definidos³ y los operadores bien entrenados para minimizar lo más posible la variabilidad en su ejecución, ya que algunos aparatos o maquinaria, requieren ser desarmados para eliminar residuos en áreas de difícil acceso. Se debe realizar una inspección anterior a la limpieza para eliminar acumulaciones de residuos y mantener la reproducibilidad del proceso de limpieza asegurando que el equipo se encuentra en el mismo estado de *suciedad* antes del paso de limpieza cada vez que el procedimiento se ejecute.

Dentro del procedimiento de limpieza se deben especificar los agentes químicos aprobados a emplear, las concentraciones adecuadas identificadas; si es importante observar la temperatura, definirla y los pasos que involucraría si se requirieran agentes ácidos o alcalinos para la limpieza. Se deben detallar las instrucciones paso a paso.

Si el lavado se realiza con agua, los residuos materiales deben ser removidos y proceder con el enjuague inicial; a veces basta uno solo pero es muy común realizar varios enjuagues. Se puede utilizar agua purificada, agua para inyectables o a veces agua potable siempre y cuando el enjuague final y el secado demuestren el nivel apropiado de limpieza. El enjuague final se utiliza para reducir las cantidades de residuos hasta el nivel final sin introducir más contaminantes potenciales. El agua de la más alta calidad disponible se utiliza para este enjuague.

En los procesos semiautomatizados se requiere una mayor participación del operador que en uno automatizado.

En un proceso automatizado, se obtiene una mayor reproducibilidad del manual de procedimientos y debido a la disminuida intervención del operador, los procedimientos deben ser diseñados para manejar una gran variedad de condiciones de equipo para ser efectivos.⁴

Antes de lanzar un programa de validación, es importante realizar una investigación previa para asegurar que los procedimientos de limpieza, controles y sistemas de documentación se encuentren en su lugar. La documentación debe ser exacta y trazable. Debe existir un control sobre el material de limpieza, las herramientas auxiliares y el equipo utilizados en la limpieza. El material seleccionado para la limpieza, como cepillos, fibras y/o esponjas, no debe desprender pelillos, pelusas o fibras. Estos implementos de limpieza no requieren validación formal, pero pueden ser una fuente de contaminación adicional si no se tiene el cuidado adecuado⁵.

Para minimizar variaciones, se deben mantener disponibles los implementos antes mencionados para el operador. Al equipo o instrumentos que van a ser limpiados, están siendo o ya fueron limpiados, se les debe de colocar una etiqueta que así lo indique, aunque por cuestiones prácticas y de tiempo resulte

³ Los PNO's deben ser lo suficientemente detallados e incluso contener listas de verificación, donde los operadores deben registrar la realización de la limpieza en los puntos necesarios; dichos puntos deben ser especificados por los departamentos de Control de Calidad, Producción y Validación.

⁴ Los sistemas CIP (Clean In Place) "Limpieza in Situ", cada vez aparecen más frecuentemente en el diseño de equipos de fabricación de medicamentos.

⁵ De preferencia debe existir el Certificado del fabricante de estos materiales donde asegure lo anterior.

poco factible. Se debe llevar un registro de los lotes fabricados, de las limpiezas y mantenimiento para tener la historia completa de una pieza particular de equipo y encontrar las causas de los problemas con mayor rapidez y visualizar su influencia sobre otros lotes.

La frecuencia de limpieza depende de las operaciones de manufactura utilizadas, de los productos involucrados y del uso y mantenimiento del equipo, de las políticas de la compañía, etc. Todas las instrucciones deben estar especificadas y detalladas en los procedimientos correspondientes de limpieza.

Es más riguroso un procedimiento de limpieza entre lotes de productos diferentes que entre lotes del mismo producto, ya que los activos y excipientes son los mismos y sólo varía en el tamaño del lote o en las cantidades de activos o excipientes y se requiere sólo un monitoreo en la contaminación microbiana; mientras que para lotes de productos diferentes fabricados en una misma máquina, aumenta el riesgo de contaminación con residuos del anterior.

Los procesos de mantenimiento son potencialmente contaminantes a los equipos, por lo que tras terminarlos debe seguirles una limpieza rigurosa.

Debido a que la validación no puede cubrir todos los posibles contaminantes, es crítico hacer pruebas para el contaminante en particular, involucrado en una contaminación accidental.

Un método de verificación de limpieza consiste de la recolección de una muestra, preparación de la misma y su análisis. Las muestras se recolectan con un hisopo que ha sido humedecido en el solvente adecuado para solubilizar la sustancia de interés al pasarlo sobre un área de 10 cm². El hisopo deberá estar fabricado de un material inerte. Como primera elección se tiene el *Technicloth* de la compañía Texwipe. En el caso de que se requiera la extracción de algún componente de la muestra que interfiera con su análisis, deberá ser documentado.

El desarrollo de un método de verificación de limpieza se puede lograr "sembrando" una cantidad conocida de la sustancia en una placa hecha del mismo material que se encuentra en el área de manufactura, se deja secar y se pasa un hisopo de la misma manera que se hará en el área de manufactura, desplazando el hisopo en varias direcciones, para lograr una máxima cobertura de área. (ver diagrama 2)

En los casos donde pasar un hisopo no sea práctico o necesario, se utilizará el método de enjuague (por ejemplo: equipo y maquinaria). El solvente para la sustancia será escogido de acuerdo a las características de solubilidad de la misma y resaltando la seguridad. Para la preparación de la muestra se utiliza un paso de extracción de la misma, adsorbida en el hisopo. Se utilizan de 5 a 20 mL de solvente para no afectar la sensibilidad del método por la dilución. El método de análisis de las soluciones resultantes dependerá de una variedad de factores, pero el más empleado es el HPLC debido a su especificidad, sensibilidad y facilidad de uso.

Otros métodos más rápidos se pueden emplear, por ejemplo el TOC y espectroscopia UV donde no interfieran los excipientes.

Los procedimientos y programas de limpieza deben estar presentes en el lugar y estar validados, y para los que se utilizan con poca frecuencia el procedimiento debe revisarse en cada ocasión. La eliminación de los agentes limpiadores de las superficies limpiadas al terminar el proceso de limpieza, debe ser validada.

Todas las limpiezas deben ser registradas.

En lo que se refiere a la contención del producto y su recolección, éste debe ser mantenido dentro del sistema del proceso de fabricación y su contención localizada, y los sistemas para recolección deben estar correctamente diseñados de tal forma que se recolecte el producto en el lugar de origen.

En cuanto a los sistemas de manejo de aire, se deben tomar en cuenta, la disminución de la diseminación del producto por medio de un cuidadoso diseño de las zonas de manejo de aire, y los siguientes factores:

- Sistemas de manejo de aire dedicados a departamentos específicos de producción
- Sistemas de manejo de aire dedicados a operaciones de fabricación y de no fabricación, por ejemplo: acondicionamiento en envase primario y secundario, laboratorios, etc.
- Sistemas de manejo de aire dedicados para productos con principios activos específicos
- Esclusas entre zonas de manejo de aire

Para disminuir la contaminación de producto entre las zonas de manejo de aire, se debe considerar a las esclusas con presión de aire negativa, ya que existe el riesgo de llevar producto entre dos zonas adyacentes.

Con una esclusa de presión positiva se debe cuidar que no se suministre aire de una fuente contaminada con producto.

Los cuartos deben contar con un sistema de presión diferencial para disminuir la diseminación de productos, asegurándose de que la dirección del aire sea controlada, esto es, para evitar el paso de producto de una zona contaminada a otra no contaminada.

Para elegir entre los sistemas de recirculación del aire contra uno donde el aire pasa una sola vez, hay que considerar que el aire que regresa a la unidad manejadora de aire, puede estar contaminado, si el sistema está dando servicio a otras áreas críticas de fabricación y que los filtros HEPA provean la protección adecuada contra la contaminación cruzada del producto.

La principal función de un sistema de manejo de aire ambiental, es proporcionar condiciones ambientales de temperatura y humedad. Las normas generales de limpieza ambiental son proporcionadas por dicho sistema, mediante la dilución del aire del cuarto contaminado con partículas, con aire suministrado libre de partículas, reduciendo así la cuenta de partículas y permitiendo una rápida limpieza después de las operaciones de fabricación.

La buena distribución del aire en los cuartos, tiene como propósito disminuir el estancamiento de aire, las corrientes y los gradientes de temperatura. Para lograrlo, el aire es suministrado generalmente de forma que se asegure una mezcla completa, de tal manera que el aire está sujeto predominantemente a un flujo turbulento; por lo tanto la distribución del aire en las salas no proporciona un control significativo sobre la distribución de partículas durante la manufactura en productos liberados.

Para el uso de los filtros HEPA, se debe considerar si el área de producción está contaminada con producto y por lo tanto, también lo estarán los ductos de retorno de aire y la planta de manejo de aire; si los filtros HEPA son necesarios en los retornos principales de las plantas de manejo de aire y en los retornos de las salas para evitar la contaminación cruzada y disminuir el riesgo de migración de producto de un área de fabricación a otra a través del sistema de ductos de distribución y si se requieren los filtros en las terminales de suministro de aire de las salas, aún cuando la planta no está operando.

En lo concerniente a las plantas de manejo de aire, se debe considerar el riesgo de contaminación cruzada del producto de una planta a otra durante los procedimientos de mantenimiento y limpieza; de igual manera, considerar lo siguiente:

- Segregación de las plantas del sistema de manejo de aire
- Ubicación externa de los sistemas de recolección de polvos de las plantas de manejo de aire al edificio de fabricación
- El uso seguro de filtros de cambio cuando estén colocados en corrientes de aire contaminadas con producto

Se debe considerar igualmente, las tomas y salidas de aire fresco a la atmósfera, para eliminar el riesgo de contaminación cruzada por contaminación entre las corrientes de aire.

Durante el diseño de un proceso, se debe observar que el manejo y transferencia del producto estén contenidos en un sistema cerrado, que eviten la contaminación del entorno de trabajo y los problemas subsecuentes de dispersión, además de reducir al mínimo el riesgo de problemas de salud laboral. Al diseñar los procesos, se debe tratar de lograr un mínimo contacto manual, ayudándose de la descarga directa de un recipiente a otro, para mantener el proceso en un entorno cerrado. En los casos donde no se pueda mantener un entorno cerrado, los contaminantes deben ser recolectados en su sitio de origen.

Las líneas de proceso se diseñan por medio de Diagramas de Flujo en Proceso y Diagramas de Tuberías e Instrumentos. Estos planos son importantes en la prevención de la contaminación cruzada.

Las tuberías deben diseñarse para evitar la mezcla de gases, agua y otras sustancias extrañas, a menos que se requieran en el proceso. Las válvulas de chapeleta (válvulas check) y otros dispositivos que impiden el reflujo deben estar incorporadas en el diseño para evitar la mezcla de fluidos y gases durante el proceso de manufactura.

El diseño de las instalaciones debe considerar siempre la contaminación cruzada, por lo tanto los acabados arquitectónicos y el plano de las salas son importantes. Hay que considerar también los movimientos de personal y de producto a través de las instalaciones, las direcciones de las corrientes de aire y sus flujos en el diseño.

En el diseño de equipo se debe tomar en cuenta las superficies que estarán en contacto directo con el producto o que sean potencialmente contaminantes, y utilizar proveedores de equipo aprobados; cuyos equipos cuenten un con diseño que permita asegurar la alta calidad y consistencia en el mismo. Antes de empezar la fabricación se debe realizar una inspección detallada de las especificaciones del diseño del fabricante.

Cuando sea posible, el equipo deberá estar dedicado exclusivamente a productos específicos. Deberá estar diseñado de tal manera que las áreas que pudieran retener residuos de fármacos, estén reducidas

al mínimo; las superficies deberán ser lisas y libres de escoriaciones, no deberán ser reactivas, aditivas ni absorbentes. Puede ser necesario incorporar instrumentos de limpieza en el equipo como boquillas y varillas de aspersión o difusores esféricos para aspersión, como parte del diseño. Deben estar colocados en el equipo de manera que se logre una cobertura adecuada y se deben colocar drenajes en el equipo. Las conexiones y válvulas para aplicaciones que tengan contacto con el producto deben ser de especificación sanitaria.

La limpieza en el lugar LL o CIP (CIP: Clean In Place), es un sistema que implica otro sistema de agua circulante o de un solo uso y soluciones químicas o limpiadoras que se descargan a través de la planta mientras el equipo está armado y en su lugar. Se limpia de tal manera que todas las superficies limpiadas sean de un grado aceptable y sean consistentemente reproducibles. Los sistemas LL se utilizan comúnmente para eliminar la exposición del personal y ambiental al contaminante. Estos sistemas de limpieza son efectivos cuando el cierre o desarmado de equipo en producción, pudiera impactar en la eficacia de manufactura. También son utilizados para mejorar la consistencia y reproducibilidad del proceso de limpieza. Los sistemas LL deben ser validados aún cuando sean computarizados.

El diseño de estos sistemas debe ser considerado desde el principio, ya que una readaptación resulta difícil y costosa.

El término de limpieza fuera del lugar o LFL (COP: Clean Of Place), describe el retiro, desensamblaje y apertura de equipo de proceso y sistemas para limpieza, en condiciones diferentes a las de operación. El diseño debe contemplar la facilidad para desarmar, rearmar e inspeccionar el equipo.

Los sellos del equipo como por ejemplo, en los ejes rotatorios de los agitadores, no deben entrar en contacto con el producto y en caso de que lo hagan, sus lubricantes deben ser de grado alimenticio, si lo permite el fabricante. Algunas veces se requiere purgar con nitrógeno para evitar acumulaciones de materiales en las áreas difíciles de limpiar. Las válvulas y dispositivos activadores utilizados para desviar los flujos del producto, deben estar adecuadamente programados y validados para asegurar su correcto funcionamiento.

Los sistemas computarizados para procesos, cada vez son más comunes y como están basados en microprocesadores, deben estar programados, probados y validados para evitar la exposición de un producto con otro o con materiales extraños debido a fallas en el control.

Se recomienda el uso de sistemas de recolección de polvos en el "punto de uso", en aquellos lugares donde se manejen éstos materiales. Estos sistemas requieren de un diseño adecuado para captar el polvo generado durante la operación de manejo. Es deseable que el sistema esté dedicado a un solo proceso o línea de producto en caso de que se requiera recuperar los polvos.

CAPÍTULO IV

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Inicialmente, se planteó la Calificación del Instrumento y la Validación del método analítico por TOC; dichas validaciones incluyen la Operación y Funcionamiento del instrumento, Límite de detección y cuantificación; la Precisión, Adecuabilidad y Exactitud del método, etc. Todo lo anterior se realizó debido a que los métodos analíticos empleados en la industria farmacéutica, requieren estar validados antes de emplearse para asegurar que arrojarán resultados confiables y consistentes a lo largo del análisis.

Se calificaron el Diseño, la Instalación, la Operación y el Funcionamiento del instrumento, con un checklist donde se verifican las partes que lo componen, y su correcta activación al encender el instrumento. Se verificó el correcto despliegue de ventanas, así como el encendido y apagado de las funciones.

Calificación de Diseño.

Tabla 1. Lista de Calificación de Diseño.

DOCUMENTACIÓN	EXISTE? SI/NO	REVISÓ FIRMA/FECHA	Observaciones
Especificaciones	SI	F.A. 02/mar/00	En Especificaciones
Diagramas de Ingeniería	N/A	F.A. 02/mar/00	--
Diagramas de Flujo	SI	F.A. 02/mar/00	Manual sección Operación
Controles de Cambio	N/A	F.A. 02/mar/00	--
Lista de Equipo	SI	F.A. 02/mar/00	--
Lista de Instrumentos	N/A	F.A. 02/mar/00	--
Lista de Unidades críticas (Definiendo rango, precisión y exactitud)	N/A	F.A. 02/mar/00	--
Catálogos de Instrumentos	SI	F.A. 02/mar/00	Diagrama Sección de mantenimiento
Registros de Compra	SI	F.A. 02/mar/00	--
Manual de Usuario	SI	F.A. 02/mar/00	--
Instrumento Portátil	SI	F.A. 02/mar/00	--
Los reactivos aseguran su funcionamiento adecuado	SI	F.A. 02/mar/00	--
Se conoce su rango operativo	SI	F.A. 02/mar/00	En Especificaciones
Puede usarse manualmente y con software	SI	F.A. 02/mar/00	Requiere PC con software cargado
Se desensambla para facilitar su limpieza	SI	F.A. 02/mar/00	Automuestreador y mangueras del TOC
Contiene partes reemplazables	SI	F.A. 02/mar/00	Manual de uso

Calificación de Instalación.

Sólo se ensambla el automuestreador debido a que viene empacado en piezas sueltas. El TOC sólo es conectado a la computadora y al suministro de energía eléctrica.

Tabla 2. Lista de apoyo a la Calificación de Instalación⁶.

Paso	Descripción	¿Cumple? SI / No
1.	Todos los accesorios recibidos	SI
2.	Condiciones del lugar cumplen con especificaciones	SI
3.	Automuestreador preparado	
3.1	Switch en posición apagado	SI
3.2	Cable de suministro de electricidad conectado al automuestreador y a la toma	SI
3.3	Cable de datos conectado al automuestreador	SI
3.4	Aguja ensamblada y pie en su lugar	SI
3.3	Viales limpios de 1/8" a 1/4"	SI 1/8"
3.4	Orificio del bloque de soporte de la aguja centrado con el vial	SI
3.5	La aguja no sobrepasa el bloque	SI
3.4	Aguja centrada en orificio del bloque del soporte	
4.	Computadora preparada	
4.1	Switch de encendido de la computadora en posición apagado	SI
4.2	Cable de toma de corriente conectado a la computadora y a la toma	SI
5.	Impresora preparada	
5.1	Switch de encendido en posición apagado	SI
5.2	Cable de corriente conectado a la toma	SI
5.3	Papel colocado en la impresora	SI
5.4	Cable de datos conectado a la impresora	SI
5.5	Cable de la impresora conectado al puerto de impresora en la computadora	SI
6.	Cable de datos del instrumento conectado al puerto serial de la computadora	SI
7.	Instrumento preparado	
7.1	Switch en posición apagado	SI
7.2	Cable de corriente conectado al instrumento y a la toma de corriente	SI
7.3	Cable de datos de la computadora conectado al puerto serial	SI
7.4	Cable de datos del automuestreador conectado al puerto auxiliar	SI
7.5	Manguera de muestra de la aguja conectada a la entrada de muestra del TOC	SI
7.6	Manguera de salida de residuos del TOC hacia un contenedor de residuos	SI
7.7	Acido y oxidante instalados	SI 01/mar/00
7.8	Válvulas de ambos reservorios oprimidas en verde	SI
7.9	Fecha y hora instalada	SI 9:40 am 01/mar/00

⁶ Esta es una lista de apoyo a la calificación de instalación, proporcionada por el fabricante, no aplica por lo tanto a la validación.

Calificación de Instalación.

Tabla 3. Lista de Calificación de Instalación.

DOCUMENTACION	EXISTE? SI/NO	REVISOR FIRMA/FECHA
Manual del usuario	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Manuales y/o catálogos de instrumentos críticos	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Instalación de servicios e interfaces	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Lista de partes mecánicas y eléctricas	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Lista de refacciones	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Condiciones operativas (puntos de ajuste)	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Diagramas eléctricos	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Diagramas mecánicos	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Diagramas "as built"	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Certificados de calibración	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Programa impreso o diagrama de flujo (en caso de PLC o PC)	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Sistemas de seguridad física	NO*	F. Arredondo 02/03/00.
Sistemas de seguridad lógica	SI	F. Arredondo 02/03/00.
Acabados y materiales	SI	F. Arredondo 02/03/00.

*No son necesarios, ya que el instrumento no cuenta con partes que representen un peligro a la integridad física del usuario, salvo el mal manejo de la aguja del automuestreador.

Calificación de Operación.

El TOC modelo 800 consiste en nueve componentes principales:

- 1 Sistema de entrada de muestra y bomba peristáltica
- 2 Reservorios de reactivos químicos (Acido y Oxidante)
- 3 Jeringas para los reactivos
- 4 Divisor de flujo
- 5 Reactor de oxidación
- 6 Sensores de CO₂ consistentes en:

6.1 Circuito de Agua Deionizada (DI Loop)

6.2 Módulo de membrana

6.3 Celda de medición de temperatura y conductividad:

- 6.3.1 Controlador del microprocesador y electrónicos
 6.3.2 Almacenamiento de datos del tablero
 6.3.3 Salida de datos

Tabla 4. Lista de Calificación de Operación.

Pruebas	Pasa? SI/NO	Realizó/ verificó/ Fecha	Observaciones
Verificación de operación individual de cada uno de los instrumentos críticos:			
Aguja	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Rieles	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Bomba peristáltica	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Verificación de operación del software (entrada correcta a los menús y fijación de valores)	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Fija los valores introducidos
Verificación de operación del equipo:			
La aguja sube y baja	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Corren los rieles?	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Funciona el avance manual de los rieles?	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Lecturas de calibración dentro del rango?	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Se detiene el análisis desde la opción STOP?	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Verificación de ajuste de parámetros:			
Reagent flush	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Flujos de reactivos	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Número de muestras	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Acepta las muestras
Capacidad de los viales	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	40 mL
Repeticiones	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Acepta el valor
Número de rechazos	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Por Default
Impresión a determinado número de muestras	SI	F. Arredondo 02/mar/2000	Funcionamiento normal
Verificación de la operación de las unidades de detección y los mecanismos de rechazo.			
Límite de detección	N/A	N/A	Se realiza durante la validación del método analítico

Calificación de Funcionamiento.

Antes de calificar el Funcionamiento del instrumento con la prueba de Adecuabilidad, se procedió a su calibración utilizando el correspondiente set de estándares, de Ftalato ácido de Potasio con 25 ppm de carbono y Carbonato de Sodio con 25 ppm de carbono, usando como blanco, agua destilada.

El criterio para la verificación de la Calibración marca que:

- ❖ El valor promedio de la lectura de TC del estándar de TC, deberá estar dentro del $\pm 3\%$ del valor ajustado del estándar $TC_{adj,TC}=25.0418$ ppm (ver hoja de registro de constantes de calibración en anexo 8.2) .
- ❖ La diferencia entre las lecturas de los canales de TC e IC para las lecturas del estándar de IC, no deberá diferir en $\pm 3\%$ del valor del estándar de IC.

Los resultados y los cálculos son los siguientes:

Valor $TC_{adj,TC}= 25.0418$ ppm:

- $+3\% = 25.793054$ ppm
- $-3\% = 24.290546$ ppm

Valor de TC promedio del segundo estándar de TC: 25.2 ppm, el cual se encuentra dentro del rango establecido de $\pm 3\%$ del valor obtenido de $TC_{adj,TC}$ y por lo tanto pasa la calibración para el canal de TC.

Valor nominal del estándar de IC: 25 ppm

- 3% del valor nominal del estándar: 0.75 ppm

Valores promedio de lecturas del estándar de IC:

- Canal TC = 25.9 ppm
- Canal IC = 26.0 ppm

Entonces $IC - TC$ no debe ser $< 0 >$ de 0.75 ppm.

$(IC) 26.0 \text{ ppm} - (TC) 25.9 \text{ ppm} = 0.1 \text{ ppm}$

En la verificación de calibración se encontró que los valores obtenidos en las lecturas de los estándares, cumplen con la especificación del fabricante y por lo tanto el instrumento se encuentra calibrado y se puede proseguir con la prueba de Adecuabilidad para la calificación del funcionamiento del instrumento.

La Calificación del Funcionamiento se realizó con la prueba de Adecuabilidad, para lo cual se adquirieron los estándares de 1-4, *Benzoquinona* 500 ppb y *Sacarosa* 500ppb, con el fabricante del instrumento.

- i. Por duplicado; un estándar de Benzoquinona con 500 ppb de carbón y otro de Sacarosa con 500 ppb de carbón⁷.
- ii. Se leyeron en un protocolo con 9 repeticiones y 4 rechazos para cada vial, para que finalmente se emplearan en los cálculos de desviación estándar y coeficiente de variación, cinco datos (no se toman en cuenta los cuatro primeros datos) de los segundos viales.
- iii. Se utilizaron las lecturas promedio de TOC de los segundos estándares, para calcular la eficiencia de la respuesta del instrumento, con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de respuesta (\%)} = \frac{(\text{TOC}_{\text{suitability}} - \text{TOC}_{\text{blanco}})}{(\text{TOC}_{\text{sucrosa}} - \text{TOC}_{\text{blanco}})} \cdot \frac{C_{\text{sucrosa}}}{C_{\text{suitability}}} \cdot 100$$

$$\text{Eficiencia de respuesta (\%)} = \frac{(514 - 10.3)}{(507 - 10.3)} \cdot \frac{(500 \text{ ppb})}{(500 \text{ ppb})} \cdot 100$$

$$\text{Eficiencia de respuesta (\%)} = \frac{503.7 \text{ ppb}}{496.7 \text{ ppb}} \cdot 100$$

$$\text{Eficiencia de respuesta (\%)} = 101.409 \%$$

- iv. La eficiencia de la respuesta para el TOC, es de 101.409%, que de acuerdo con el criterio de aceptación, entra en el rango de 85 % y 115 %; por lo tanto se considera que el instrumento pasa la prueba de adecuabilidad. Este criterio de aceptación, fue establecido por el fabricante del instrumento. Se cuenta también con otro parámetro de aceptación, que es el coeficiente de variación, el cual deberá ser menor al 2%.

Tabla 6. Resultados de los coeficientes de variación de la Prueba de Adecuabilidad

SUSTANCIA	C. V. (%)
Estándar de sacarosa con 500 ppb de carbón	0.4090 %
Estándar de benzoquinona con 500 ppb de carbón	0.2536 %

Una vez realizado lo anterior, se procedió a la Validación del Método Analítico por TOC.

⁷ Estos estándares fueron comprados al fabricante del instrumento.

Validación del Método Analítico

1. **PRECISIÓN DE SISTEMA (ERROR SISTEMÁTICO CONSTANTE).**- Es la medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del instrumento bajo las condiciones normales de operación. Se expresa en términos de desviación estándar o coeficiente de variación.

Procedimiento.

- i. Se limpió todo el material de vidrio, primero lavándolo con una solución de Extrán y enjuagándolo con agua purificada cinco veces seguidas, después se volvió a enjuagar, esta vez con agua destilada tres veces seguidas y se secó con una tela Tex-wipe, que no libera fibrillas ni pelusas, esto es para disminuir al máximo cualquier posible contribución de TOC por los materiales empleados.
- ii. Durante todo el proceso de preparación de estándares, así como de lectura de los mismos, se utilizaron guantes estériles libres de polvo, cubrebocas y cofia; para evitar en la medida de lo posible, cualquier contaminación por CO₂ ambiental y por grasa cutánea en el manejo del material de vidrio que pudieran elevar las lecturas de TOC.
- ii. Se pesaron cerca de 20 gramos de sacarosa en un pesafiltros y se secaron a 105°C durante 5 horas y se dejó enfriar dentro del desecador. De esta forma, la sacarosa quedó lista para ser empleada en la preparación de los estándares.
- iii. En un pedazo de papel aluminio⁸ seco y limpio, se pesaron aproximadamente 0.0594g (+/- 0.0001g) de la sacarosa. (Se calculó el peso real de sacarosa, por diferencia con el del papel aluminio)
- iv. Se transfirió la sacarosa a un matraz volumétrico de 1L, enjuagando el papel con agua destilada. Se llenó el matraz a la mitad de su capacidad y agitó suavemente para disolver toda la sucrosa. Posteriormente se aforó.
- v. Esta solución tiene una concentración de 25,007 ppb de carbono y se calculó de la siguiente manera:

$$(0.0594) * (0.421 * 10^6) = \text{ppb de carbono}$$

*donde 0.0594 es el peso en gramos de la sacarosa

*0.421 es la cantidad de carbono que contiene la sacarosa

*10⁶ es el factor de conversión de gramos a microgramos para obtener ppb.

- vi. Inmediatamente después, se cubrió con papel aluminio la boca y tapa del matraz que contenía la solución para evitar disolución de CO₂ del ambiente. Se invirtió suavemente el matraz tres veces, para homogenizar la solución.

⁸ Se empleó papel aluminio por la pequeña cantidad de sacarosa a pesar, ya que de haber empleado una nave de vidrio, ésta introduciría ruido durante el pesado, reduciendo la exactitud de la cantidad pesada.

vii. De esta solución, se tomaron seis alícuotas de 10 mL cada una con una pipeta volumétrica y se transfirieron a sendos matraces volumétricos de 500mL con agua destilada hasta la mitad de su capacidad. Se agitaron y aforaron.

viii. Se calculó la concentración final de la siguiente manera:

$$\text{ConStd. (ppb C)} = \frac{\text{conc. del stock (ppb C)}}{50}$$

ix. Como concentración final se tienen 500 ppb de carbono en cada matraz.

x. Todos los pasos se realizaron con rapidez y sin crear burbujas en los recipientes, para evitar disolución del CO₂ del ambiente.

xi. Se dosificaron seis viales nuevos⁹ por cada matraz, con la solución de 500 ppb y se taparon. Se etiquetaron como solución std de 500 ppb para precisión del sistema.

xii. Se colocaron en el automuestreador para proceder a su lectura junto con un blanco del agua destilada empleada para su preparación como vial #1.

xiii. Desde la PC se creó un protocolo de lectura con 6 repeticiones de lectura y el reporte del coeficiente de variación.

xiv. Se ajustó el flujo de oxidante a 0.0 µL y de 0.75 µL para el ácido, de acuerdo con la tabla de flujos recomendados por el fabricante.

xv. A las lecturas promedio de TOC de cada muestra de estándar, se les restó la lectura de TOC obtenida para el blanco, ya que ésta fue con la que se prepararon los estándares:

Tabla 7. Resultados de precisión de sistema.

<u>Muestra</u>	<u>Lectura promedio de TOC (ppb)</u>	<u>Promedio - TOCblanco (ppb)</u>
Blanco de agua	145	-
Std 1	648	503
Std 2	661	516
STD 3	661	516
Std 4	661	516
Std 5	667	522
Std 6	667	522
<u>DESV. EST: 6.94022</u>	<u>PROM.: 515.83333</u>	<u>CV= 1.345%</u>

xvi. Se obtuvo el coeficiente de variación de las lecturas del estándar menos la lectura del blanco; el cual fue de 1.345% y cumple con el Criterio de Aceptación.

⁹ Viales "Eagle Picher", Environmental Containers,/TOC Sampling Containers, U.S.A.

2. LINEARIDAD DE SISTEMA (ERROR SISTEMÁTICO PROPORCIONAL).- Es la relación que se establece mediante un modelo lineal, entre una propiedad física, química y/o biológica con la cantidad de analito.

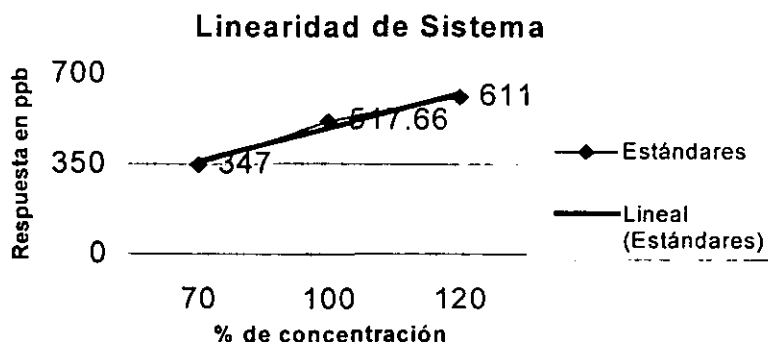
Procedimiento.

- i. Se prepararon soluciones estándares a tres niveles: 70%, 100% y 120% .
- ii. Para preparar la solución al 70% de carbono, se pesaron 0.0423.g de sacarosa, se llevaron a 2L y de ésta solución se tomó una alícuota de 10 mL y se aforó a 250 mL. Esta solución tiene 350 ppb de carbono como concentración final.
- iii. Para la solución al 100%, se pesaron 0.0593g de sacarosa y se llevaron a 1L, de ésta solución se tomó una alícuota de 10 mL y se llevó a 500 mL. Esta solución tiene una concentración final de 500 ppb de carbono.
- iv. Para la solución al 120%, se pesaron 0.0710g de sacarosa y se llevaron a 1L. De ésta solución se tomó una alícuota de 5mL y se llevó a 250 mL. Esta solución tiene una concentración final de 600 ppb de carbono.
- v. Se llenaron tres viales con cada solución y se etiquetaron con la correspondiente concentración.
- vi. Se utilizó un flujo de 0.75 μ L de ácido y de 0.0 μ L de oxidante.
- vii. De cada estándar a cada concentración, se llenaron tres viales y se leyeron en un protocolo de 5 repeticiones para cada uno.
- viii. Se utilizaron los promedios para elaborar una gráfica de respuesta obtenida vs concentración teórica:

Tabla 8. Resultados de Linearidad de sistema.

Concentración teórica	Respuesta promedio del TOC
350 ppb (70%)	347 ppb
500 ppb (100%)	517.66 ppb
600 ppb (120%)	611 ppb

Gráfica 1. Linearidad del Sistema.



- ix. Se realizó una regresión lineal a los datos de las lecturas promedio, y se obtuvo un coeficiente de determinación de $r=0.9982$, el cual cumple con el criterio de aceptación que marca un $r>0.98$.

3. EXACTITUD AL 100%(RECOBRO AL 100%).- Es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de la referencia. Se expresa como el porcentaje de recobro obtenido del análisis de las muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia (placebo cargado)¹⁰

Procedimiento.

- i. Se prepararon por separado, seis estándares de sucrosa a 500 ppb de carbón, como se describió anteriormente. Se leyeron junto con un blanco de agua destilada, en un protocolo de cuatro repeticiones y un rechazo para cada muestra.
- ii. Se llenó un vial para cada solución y se etiquetaron con un número correspondiente al número de solución stock.
- iii. Se leyeron por triplicado en un protocolo de lectura de muestras individuales con un rechazo.
- iv. Se utilizó un flujo de 0.0^{11} μL de oxidante y $0.75 \mu\text{L}$ de ácido.
- v. Se graficó el porcentaje obtenido de las lecturas vs el porcentaje de sustancia agregada ($100\%=500$ ppb) y se calculó el intervalo de confianza en el software para métodos analíticos: SEVMA; el cual fue el siguiente:
 - Límite superior de confianza: 102.146 ppb
 - Límite inferior de confianza: 98.5874 ppb

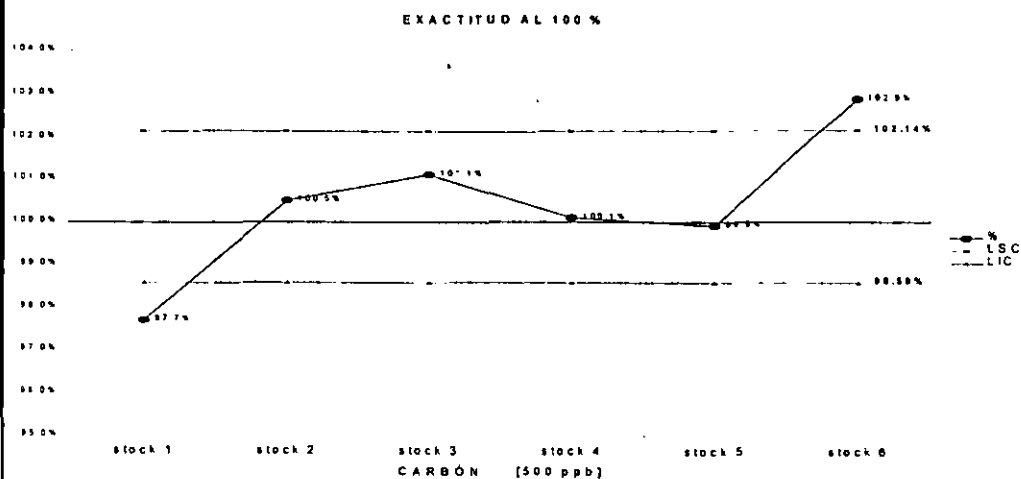
¹⁰ Regulación sanitaria para establecimientos de la Industria Químico Farmacéutica P NOM-060-SSA1-1993.

¹¹ Al instrumento se le debe introducir la cantidad de oxidante a emplear, de acuerdo al contenido de TOC esperado y basándose en la tabla de flujos recomendados. Para este nivel de TOC, no es necesario emplear oxidante, por lo que se introduce el valor de 0.0 microlitros.

Tabla 9. Resultados de Recobro al 100%.

Carbón [500 ppb]	%
stock 1	97.70%
stock 2	100.50%
stock 3	101.10%
stock 4	100.10%
stock 5	99.90%
stock 6	102.90%

Gráfica 2. Exactitud del sistema.



vi. El instrumento reporta una exactitud confiable a partir de una solución de concentración conocida.

4. ADECUABILIDAD (ESPECIFICIDAD).- Es la respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a los componentes de la muestra.

Procedimiento.

i. Se realizó la Prueba de Adecuabilidad descrita en la Calificación del Funcionamiento, y se obtuvieron resultados que cumplen con el criterio de aceptación.

5. **PRECISIÓN INTERMEDIA DEL MÉTODO**- Es el grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación.

Procedimiento.

- Dos analistas prepararon en un mismo día, dos soluciones estándares de sacarosa con 500 ppb de carbono cada uno y procedieron a leerlas por triplicado en el TOC, en un protocolo de cinco lecturas para cada vial. Se utilizan las lecturas promedio de cada muestra para los cálculos.
- Al siguiente día se procedió de igual manera.
- Se calculó el coeficiente de variación de cada analista por día, para cada uno de los promedios:

Tabla 10. Resultados de Precisión de Método.

DÍA	Analista	Stock	Lectura TOC (ppb)	Promedio TOC (ppb)	C. V. (%)
1	1	1	504.3	511.08	0.95
			508.3		
			510.3		
	2	2	524.2		
			508.2		
			511.2		
2	1	1	509	510.46	0.05
			512		
			511		
		2	509.6		
			508.6		
			512.6		
	2	1	516	510.61	1.03
			514		
			513		
		2	504.9		
			507.9		
			507.9		
	1	1	506.1	510.95	0.14
			512.1		
			513.1		
	2	2	510.8		
			513.8		
			509.8		

- Se compararon en el software SAEVMA, los resultados de las lecturas obtenidas para ambos analistas en cada día, para visualizar la variación entre analistas y la variación entre días.
- Se realizó lo anterior por duplicado ya que este software solo acepta resultados de una sola solución stock y se tienen dos stocks por analista en cada día.

- vi. Los resultados permiten aseverar que el método es lo suficientemente robusto para no tener interferencia al emplearlo en diferentes días o por diferentes personas.

6. LINEARIDAD DE MÉTODO.- Es la relación que se establece mediante una recta, entre una propiedad medible (cantidad de analito recuperado) y el valor real de la propiedad (cantidad de analito adicionado).

Procedimiento.

- i. Se prepararon dos réplicas de soluciones estándares de sucrosa a tres niveles de concentración de Carbono, 80% (400ppb), 100% (500ppb) y 120% (600ppb).
- ii. Para la solución al 80% se pesaron 0.0474g de sacarosa y se aforaron en 1L y de ésta solución se tomó una alícuota de 10 mL y se llevó a 500 mL. Esta solución tiene una concentración final de 400 ppb de carbono.
- iii. Para la solución al 100%, se pesaron 0.0594g de sacarosa, se aforaron a 1L y se tomó una alícuota de 10 mL y se llevó a 500mL, dando una concentración final de 500 ppb de carbono.
- iv. Para la solución al 120%, se pesaron 0.0710g de sacarosa y se llevaron a 1L. De ésta solución se tomó una alícuota de 5mL y se llevó a 250 mL. Esta solución tiene una concentración final de 600 ppb de carbono.
- v. Se llenó un vial para cada concentración y se leyeron por separado en un protocolo con 5 repeticiones y dos rechazos¹².
- vi. Con el promedio de las lecturas de cada estándar, se construyó una gráfica de concentración porcentual vs respuesta del TOC.

Análisis 1

Tabla 11. Resultados de Linearidad de método.

Porcentaje de Concentración	Respuesta TOC promedio (ppb)	CV (%)
80 %	385.66	0.8335
100%	491	0.0
120%	611	0.2834

¹² Al introducir al programa de lectura el número de muestras a leer en el TOC, es necesario establecer el número de lecturas que descartará para realizar los cálculos estadísticos sobre las que no descarta; es decir, si se introducen 8 lecturas y 4 rechazos, quiere decir que sólo tomará en cuenta para cálculos, las cuatro últimas lecturas de esa serie y descartará las primeras cuatro, pero de cualquier manera las imprime con la leyenda de que no son tomadas en cuenta para los cálculos.

Análisis 2

Tabla 12. Resultados de Linealidad de método.

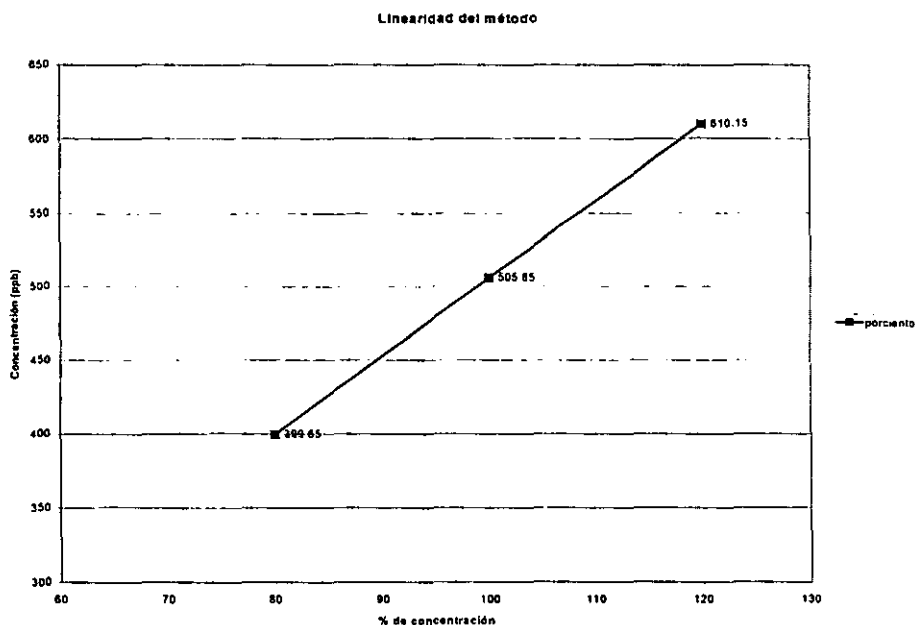
Porcentaje de Concentración	Respuesta TOC promedio (ppb)	CV (%)
80 %	413.7	0.6395
100%	520.7	0.7681
120%	609.3	0.5763

Promedio de las dos réplicas.

Tabla 13. Promedio de las réplicas de Linealidad de Método.

Porcentaje de Concentración	Respuesta promedio (ppb)
80%	399.68
100%	505.85
120%	610.15

- vii. La siguiente gráfica muestra la respuesta del promedio de las dos corridas de la prueba de Linealidad de Método:



- viii. Se calculó el coeficiente de determinación utilizando una regresión lineal; el cual fue: $r = 0.99998$ y $r^2 = 0.99997$, por lo que el método es lineal.

7. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN- DETECCIÓN: Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

CUANTIFICACIÓN: Es la menor concentración de la sustancia en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

Procedimiento.

- i. Se realizó la determinación del Límite de Detección y Cuantificación por el método de conexión en línea del instrumento, a la toma del agua destilada, hasta que las lecturas se encontraron estables durante seis horas continuas y no variaron en más de 0.4 ppb.

Tabla 7. Lecturas de las últimas seis horas en línea.

Lecturas (ppb)					
Promedio (ppb)	Desv. Std. (ppb)	C.V. (%)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)	
10.9	10.9016667	0.07700246	0.70633658	0.23100738	0.7700246
10.9					
11					
11					
11					
10.9					
10.9					
11					
10.9					
10.8					
11					
11					
10.9					
10.9					
11					
10.9					
11					
10.9					
10.9					
11					
11					
10.9					
10.9					
10.9					
10.9					
11					
10.9					
11					
10.9					
10.9					
11					
10.9					
10.8					
10.9					
10.9					
10.9					
10.8					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
11					
10.7					
10.9					
10.7					
10.9					
10.7					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					
10.9					
10.8					

- ii. Se obtuvo la desviación estándar de los datos reportados durante las seis últimas horas de lectura (60 datos) y se calculó el LOD como tres veces la misma y el LOQ como diez veces.

Validación del procedimiento de limpieza

1. Determinación de Blancos.

Para desarrollar una técnica confiable de análisis de limpieza de áreas y equipos de fabricación, se requiere determinar el aporte de los materiales empleados, tales como viales, hisopos y placas empleadas para la determinación del recobro de los hisopos.

i. Determinación del aporte de los viales.

- i.1 Se pesaron 18 viales vacíos para obtener 6 viales con la mayor similitud en peso posible.

Tabla 8. Peso de los 18 viales vacíos.

Vial vacío (peso en g)	Vial vacío (peso en g)	Vial vacío (peso en g)
26.7295	26.7721	26.8750
26.7672	26.6437	26.5452
26.4663	26.1216	26.3398
26.8004	26.2432	26.5539
26.6650	26.9648	26.0583
26.6718	26.5413	26.6401

- i.2 A los 6 viales escogidos, se les agregó 40 mL de agua con un dispensador automático "Dispensette" y se pesaron con ese volumen de agua para obtener el peso del agua por diferencia.

Tabla 9. Peso de los seis viales vacíos, con agua y cantidad de agua en cada uno.

# de vial	Vial vacío (g)	Vial con agua (g)	Peso de agua (g)	Prom= 40.0071166
1	26.5413	66.6221	40.0808	$\sigma = 0.044371442$
2	26.5452	66.5464	40.0012	
3	26.5539	66.5250	39.9711	
4	26.6401	66.6074	39.9673	C.V.=0.108409317
5	26.6437	66.6322	39.9885	
6	26.6650	66.6988	40.0338	

1.1 Aporte de TOC de los viales

- 1.1.1 Utilice 4 viales nuevos y con Certificado del valor de TOC del proveedor; uno para el blanco de agua destilada tomada directamente de la salida del destilador y los tres restantes con agua de bajo TOC.
- 1.1.2 Durante todo el manejo del material, se deben emplear guantes de latex libres de polvo.
- 1.1.3 Empleando el dispensador, dosifique en cada uno de viales, 40 mL de agua de bajo TOC y tápelos inmediatamente.
- 1.1.4 Prepare un programa de lectura para los tres viales y léalos en el TOC.
- 1.1.5 Reste el valor de TOC del blanco a cada uno de los valores de TOC de los tres viales restantes y obtenga el coeficiente de variación, el cual no debe ser mayor del 2%.
- 1.1.6 Promedie los valores de TOC de los tres viales. Éste valor de TOC, es el aporte de los viales.

1.2 Aporte de los hisopos

- 1.2.1 Dosifique a cuatro viales nuevos y con Certificado de contenido de TOC del proveedor, 40 mL de agua destilada y tápelos inmediatamente. Uno de éstos viales, es el blanco.
- 1.2.2 Utilizando guantes de látex libres de polvo y cuidando de no tocar las paredes de la bolsa, saque tres hisopos.
- 1.2.3 Abra uno de los viales y con cuidado de no tocar la punta con las tijeras, corte la punta o cabeza de uno de los hisopos y déjela caer rápidamente dentro del vial y tápelo inmediatamente.
- 1.2.4 Repita el proceso con los dos hisopos restantes en cada uno de los dos viales siguientes.
- 1.2.5 Agite en vortex a 2500 rpm durante 3 minutos y deje reposar por 24 horas. Transcurrido éste tiempo, vuelva a agitar en vortex durante 3 minutos para extraer el TOC del hisopo.
- 1.2.6 Prepare un programa de lectura para el blanco y los tres viales y colóquelos en orden de izquierda a derecha en el automuestreador y proceda a leerlos.
- 1.2.7 A las lecturas de cada uno de los viales, résteles el valor de TOC del blanco.

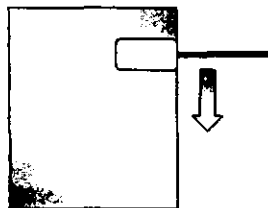
- 1.2.8 Promedie los tres valores cuyo coeficiente de variación no debe ser mayor al 2%. Éste es el aporte de TOC de los hisopos.

1.3 Aporte de las placas

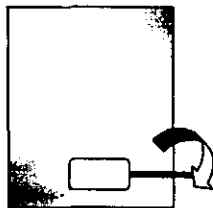
- 1.3.1 Utilizando guantes libres polvo, lave con solución de Extrán, tres placas de acero inoxidable, enjuáguelas tres veces con agua destilada y después con agua purificada¹³.
- 1.3.2 Colóquelas en una superficie cubierta con papel aluminio en una zona con poco tránsito de personas y déjelas secar al aire.
- 1.3.3 Empleando viales nuevos, dosifique con el dispensador a 4 de ellos, 40 mL de agua destilada, uno se empleará como el blanco.
- 1.3.4 A otro vial nuevo, dosifique 40 mL del agua purificada que empleó para enjuagar las placas y tápelo inmediatamente.
- 1.3.5 Llene otro vial con suficiente agua destilada para cubrir la punta de los hisopos y coloque en él 3 hisopos. Cubra con papel aluminio.
- 1.3.6 Una vez secas las placas, saque un hisopo del vial y sacúdalo para remover el exceso de agua.
- 1.3.7 Muestree una placa como indica el siguiente diagrama:

¹³ El último enjuague se realiza con agua purificada debido a que ese es el tipo de agua con que se lavan los equipos y áreas de producción y se desea determinar la cantidad de TOC que aporta el agua sobre la superficie de los equipos.

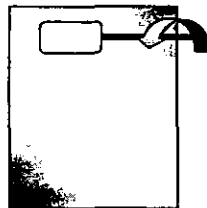
Diagrama 2. Técnica de muestreo con hisopo.¹⁴



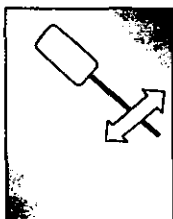
Muestree hacia
Abajo toda la placa



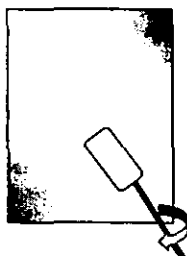
Gire el hisopo y muestree
hacia arriba desde el centro



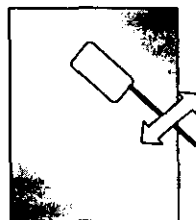
Gire nuevamente desde la
orilla izquierda y muestree
hacia abajo



Gire el hisopo y
muestree en zig-zag
hacia abajo



Gire el hisopo



Muestree nuevamente en
zig-zag hacia arriba

- 1.3.8 Abriendo uno de los viales con 40 mL de agua destilada, corte rápidamente la punta del hisopo cuidando de no tocarla y déjela caer dentro del mismo tapándolo inmediatamente.
- 1.3.9 Agite en vortex durante 3 minutos y deje reposar por 24 horas. Transcurrido éste tiempo, vuelva a agitar durante 3 minutos para extraer el TOC.
- 1.3.10 Repita la operación con las placas restantes.
- 1.3.11 Prepare un programa de lectura del blanco, los tres viales con las muestras de las placas y el quinto vial con agua purificada para compararla con la lectura de las placas.
- 1.3.12 Coloque el blanco y las muestras en orden de izquierda a derecha en el automuestreador y al final el vial con agua purificada.
- 1.3.13 Proceda a leerlas en el TOC.
- 1.3.14 A cada una de las lecturas de las muestras, résteles el valor de TOC del blanco para obtener la lectura de TOC de cada una de las placas.

¹⁴ Fuente: Calgon Vestal Technical Tip #3013

- 1.3.15 Determine el por ciento de recobro comparando con la lectura del agua destilada, la lectura de los hisopos y calcule la precisión.

1.4 Determinación del blanco del producto

- 1.4.1 Prepare una solución estándar del reactivo de interés, a 25ppb de carbono una concentración cercana, indicándola claramente.
- 1.4.2 Agite en vortex durante 3 minutos para disolución. (Los compuestos denominados tradicionalmente "insolubles" en agua, son lo suficientemente solubles en agua para ser analizados por TOC).
- 1.4.3 Proceda tal y como se indica en el 1.3.
- 1.4.4 Rocíe una de las placas con un volumen de 0.1mL-1.0mL de la solución estándar del reactivo y deje secar al aire por una hora (Volúmenes >1mL en la placa, son inconvenientes y volúmenes <100µL limitarán la precisión).
- 1.4.5 La misma alícuota que tomó para la placa, póngala en uno de los viales con 40 mL de agua destilada, de tal forma que la concentración final de Carbono, sea de 1ppm.
- 1.4.6 Calcule la desviación estándar de los valores del blanco.
- 1.4.7 Promedie los valores de TOC para los blancos.
- 1.4.8 Promedie los valores de TOC para el estándar del reactivo y calcule la desviación; que deberá ser <10% RSD.
- 1.4.9 Calcule el por ciento de recobro utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{recobro} = \frac{\text{TOC}_{\text{std}} - \text{TOC}_{\text{blanco}}}{\text{TOC teórico de la placa}} * 100$$

Donde:

$$\text{TOC teórico de la placa} = \frac{\text{conc de estándar (ppm)} * \text{mL aplicados}}{\text{Volumen de dilución}} = \frac{\text{conc std (ppm)} * \text{mL aplicados}}{40 \text{ mL}}$$

- 1.4.10 Es válido obtener un 50% de recobro, siempre y cuando éste sea reproducible.
- 1.4.11 Si el recobro es menor al deseado, se puede modificar la técnica de hisopeo y repetir las soluciones estándar.
- 1.4.12 Se puede llevar a cabo el proceso anterior para linealidad, variando las concentraciones del estándar y preparando las placas para seis niveles de concentración dentro del rango deseado.

2. Procedimiento de muestreo.

Una vez establecidas la linealidad y el por ciento de recobro, se puede cuantificar un analito.

2.1 Seleccione un número de sitios en la superficie que muestreará con hisopo¹⁵.

2.2 Utilice una plantilla de teflón para la zona donde muestreará, para delimitar el área y mantenerla del mismo tamaño, y lograr así una buena reproducibilidad.

2.3 Hisopee el área con la técnica descrita para el blanco en el diagrama # 2.

2.4 Analice las muestras junto con al menos tres blancos.

2.5 Calcule la superficie de carga de Carbono con la siguiente ecuación:

$$\text{Carga de carbono } (\mu\text{g} / \text{cm}^2) = \frac{(\text{TOC}_{\text{superficie}} - \text{TOC}_{\text{blanco}}(\text{ppm}) * \text{volumen (mL)})}{\text{Area (cm}^2\text{)} * \text{recobro}}$$

2.6 El tamaño de la superficie puede ser multiplicado por el resultado para estimar el monto total de Carbón orgánico en la superficie.

2.7 Además del muestreo con hisopo, proceder de la siguiente manera:

2.7.1 Tomar 1 muestra de 100 mL del último enjuague de la limpieza del Equipo después de haber fabricado o surtido.

2.7.2 Llenar con esa muestra un vial y taparlo.

2.7.3 Identificar el vial con la muestra y colocarlo en el automuestreador.

2.7.4 Crear un protocolo en el TOC y leer.

¹⁵ Treinta sitios. por considerarse una medida estadísticamente significativa.

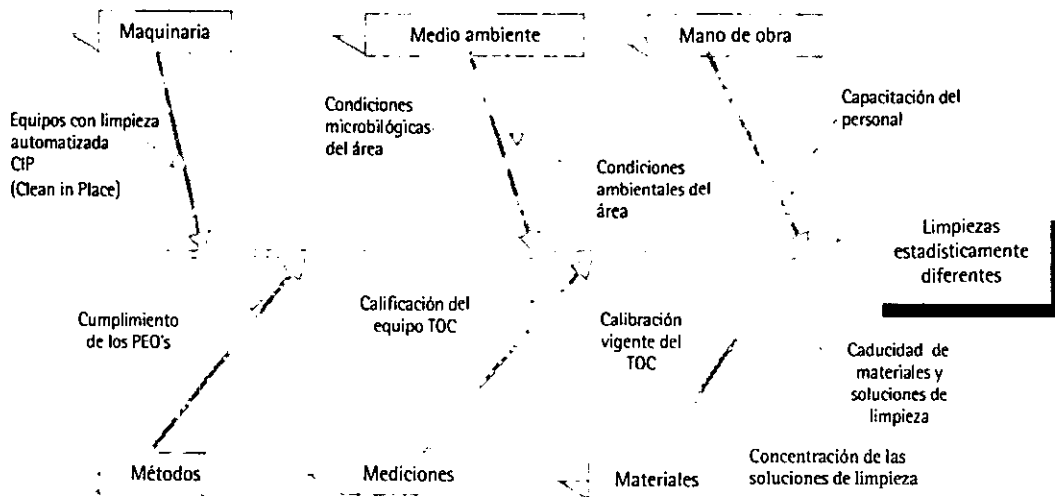
3. Robustez del Proceso.

3.1 Para conocer la robustez del proceso; también conocida como *Consistencia Estadística*, es necesario, una vez concluidas las 6 limpiezas de cada área (Con sus muestras tamaño 30 cada una), realizar un Análisis de Varianza de un factor¹⁶.

	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆
1						
2						
3						
.						
30						

3.2 El análisis de Varianza debe demostrar la igualdad estadística entre las limpiezas, de lo contrario es imprescindible iniciar una investigación de la causa raíz, pudiendo iniciar con el siguiente planteamiento:

3.2.1 "Diagrama de Ishikawa" (también conocido como "Diagrama de Pescado" o de "Causa y Efecto").



¹⁶ Puede hacerse en una hoja de cálculo como Excell o en un software estadístico como Stat Graphics.

Material	Medio Ambiente	Mano de Obra	Método	Mediciones	Material
1.- Equipo CIP	1.- Condiciones ambientales del área 1.1 Velocidad del aire 1.2 Cambios por hora 1.3 Integridad de filtros 1.4 Presiones diferenciales 2.- Condiciones microbiológicas	1.- Capacitación del personal	1.- Cumplimiento de los PEO's	1.-Calificación del equipo TOC 2.-Calibración de equipo TOC	1.-Caducidad de materiales y soluciones de limpieza

4. Verificación de Limpiezas durante la Validación

4.1 Después de cada limpieza, se solicitará a Aseguramiento de la Calidad, la determinación de trazas del activo, en el producto fabricado, surtido y/o acondicionado a continuación.

4.2 El resultado de las determinaciones de trazas en producto siguiente, es crucial en la presente validación de limpiezas.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

❖ Calificación de Diseño de los equipos TOC Modelo 800(Farma y Antibióticos).

✓ Deberá cumplirse el Checklist presentado en el Protocolo de Validación.

❖ Calificación de Instalación.

✓ Deberá cumplirse el Checklist presentado en el Protocolo de Validación.

❖ Calificación de Operación.

✓ Deberá cumplirse el Checklist presentado en el Protocolo de Validación.

❖ Calificación de Funcionamiento

✓ Deberá pasar la prueba de Adecuabilidad con Benzoquinona y Sucrosa (CV<2%).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

❖ **Validación del Método Analítico por TOC.**

- i. **Precisión de Sistema**
 - ✓ El Coeficiente de Variación debe ser igual o menor de 2%

- ii. **Linealidad de Sistema**
 - ✓ Coeficiente de Determinación debe ser superior a 0.98

- iii. **Exactitud al 100%**
 - ✓ El Intervalo de confianza debe incluir al 100

- iv. **Especificidad o Adecuabilidad**
 - ✓ Que el método no responda a los blancos.

- v. **Linealidad del Método**
 - ✓ El Coeficiente de Determinación debe ser superior a 0.98

- vi. **Precisión Intermedia del Método**
 - ✓ El Coeficiente de Variación Total debe ser menor o igual a 2%.

- vii. **Límite de Detección**
 - ✓ El límite encontrado debe ser similar al reportado por el fabricante.
 - ✓ Debe ser superior al Criterio específico de Aceptación de Limpieza para cada activo.

- viii. **Límite de Cuantificación**
 - ✓ El límite encontrado debe ser similar al reportado por el fabricante.
 - ✓ Debe ser superior al Criterio específico de Aceptación de Limpieza para cada activo.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

CALIFICACIÓN DEL INSTRUMENTO

La determinación de la Adecuabilidad es una parte fundamental en la calificación y mantenimiento del status de "Calificado" del instrumento, ya que con esta determinación se verifica que el instrumento realmente funcione de manera adecuada, retándolo a oxidar una sustancia teóricamente difícil de oxidar como lo es la Benzoquinona. En realidad la determinación de la Adecuabilidad del instrumento es una verificación del funcionamiento del instrumento, es decir, se realiza para considerar al instrumento "adecuado" para el análisis de carbono orgánico.

El instrumento cumple con los rubros establecidos para las tres etapas que constituyen la Calificación del instrumento (Instalación, Operación y Funcionamiento), por lo que el instrumento se encuentra Calificado y aprobado antes de proceder a desarrollar el método analítico.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

De acuerdo a los resultados obtenidos en las diferentes etapas de la Validación del Método Analítico, se concluye que el instrumento posee una respuesta Precisa, Lineal, Exacta y Específica y tiene un Límite de Detección y Cuantificación muy similares a los establecidos por el fabricante.

Se demostró que el Método Analítico es Preciso (repetible), Lineal y Reproducible, por lo que es el adecuado para el análisis de muestras por TOC..

En la propuesta de desarrollo de la técnica de muestreo por hisopo y su análisis, se pretende dejar el antecedente de los cuidados que se debe tener con el manejo de las muestras, ya que el análisis de TOC dista mucho de ser parecido siquiera, a un análisis de cromatografía o espectroscopía. El objeto de ella es mencionar la importancia de determinar los blancos de los materiales antes de proceder a realizar cualquier muestreo en un área productiva, ya que cualquier material empleado, posee una cantidad de carbono que debe ser determinada previamente.

GENERALES

El manejo de muestras y materiales a emplear para un análisis de TOC, debe realizarse teniendo el más absoluto cuidado, ya que aún el aire ambiental provoca un aumento en la lectura de TOC debido a que el CO_2 se disuelve en agua como carbonato; lo que provoca un aumento en la lectura de carbón inorgánico y el TOC se obtiene a partir de la resta del carbón inorgánico de la lectura de carbón total. El manejo de muestras con guantes libres de polvo y empleando cubrebocas es indispensable, por que la respiración provoca el mismo efecto mencionado para el aire y recordemos que las manos tienen grasa, la cual contienen enormes cantidades de carbón orgánico.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Validation Fundamentals, How to, What to, When to validate.* William Gibson & Keith Powell Evans. Interpharm Press, 1998. UK.
2. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories.* Ludwig Huber. Interpharm Press, 1999. UK.
3. *Improved Tablet Production System Design.* Anderson, Banker and Peck, 1999.
4. *"Points to Consider" in the Validation of Equipment Cleaning Procedures.* James Agalloco, 1999.
5. *Cleaning Technology for Pharmaceutical Manufacturing.* Destin a. Le Blanc, Douglas D. Danforth and James M. Smith. Pharmaceutical Technology, October 1993.
6. *Cleaning Validation: An Overall Perspective.* K. M. Jenkins and A. J. Venderwielen. Pharmaceutical Technology, April 1994.
7. *Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation.* K. M. Jenkins, A. J. Vanderwilen, J. A. Armstrong, L. M. Leonard, G. P. Murphy and N.A. Piros. Technology Applications 1995.