



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO  
PARA CUANTIFICAR NISTATINA EN EL PROCESO DE  
LIMPIEZA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**ESTEBAN HERNÁNDEZ JAIMES**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: Profesor: Georgina Margarita Maya Ruíz**

**VOCAL: Profesor: María del Socorro Alpízar Ramos**

**SECRETARIO: Profesor: Raúl Lugo Villegas**

**1er. SUPLENTE: Profesor: Ángel Ávila Villagrán**

**2° SUPLENTE: Profesor: Abraham Faustino Vega**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: BRISTOL – MYERS SQUIBB DE MÉXICO S. DE R.L. DE C.V., PLANTA TLALPAN.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**María del Socorro Alpízar Ramos** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Iliana Mendiola Gacía** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE (S):**

**Esteban Hernández Jaimes** \_\_\_\_\_

## CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	GENERALIDADES.....	2
2.1	Calidad y validación .....	2
2.1.1	Definición y objetivos .....	2
2.1.1	Tipos de Validación .....	3
2.1.2	Validación de métodos analíticos.....	4
2.1.3	Definición:.....	4
2.1.4	Porqué validar los métodos .....	4
2.1.5	Características de la validación de métodos analíticos.....	5
2.1.5.1	Exactitud .....	5
2.1.5.2	Precisión .....	6
2.1.5.3	Especificidad .....	6
2.1.5.4	Límite de Detección (LOD).....	6
2.1.5.5	Límite de Cuantificación (LOQ) .....	7
2.1.5.6	Linealidad.....	7
2.1.5.7	Rango .....	7
2.1.5.8	Robustez .....	7
2.1.5.9	Estabilidad .....	7
2.1.6	Etapas de la validación de un método analítico .....	8
2.1.7	Revalidación .....	11
2.2	Validación de limpieza .....	12
2.2.1	Definición y objetivos .....	13
2.2.2	Tipos de contaminación.....	13
2.2.2.1	Química .....	13
2.2.2.2	Microbiana .....	14
2.2.3	Superficies .....	15
2.2.4	Determinación de límites de aceptación .....	21

2.2.5	Técnicas de muestreo.....	28
2.2.6	Métodos de análisis y muestras.....	38
2.2.6.1	Métodos específicos .....	38
2.2.6.2	Métodos no específicos.....	49
3.	FÁRMACO.....	50
3.1	Molécula.....	50
3.2	Indicaciones terapéuticas.....	50
3.3	Contraindicaciones.....	50
3.4	Farmacocinética y farmacodinamia.....	51
3.5	Propiedades fisicoquímicas .....	51
3.6	Estabilidad y reactividad.....	51
3.7	Información toxicológica .....	51
3.8	Identificación y cuantificación .....	52
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	53
4.1	Planteamiento .....	53
4.2	Objetivos y plan del desarrollo .....	55
4.3	Pruebas preliminares .....	56
4.4	Validación del método cromatográfico .....	56
4.5	Desarrollo.....	57
4.6	Parámetros de evaluación. ....	59
5.	ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	60
5.1	Pruebas preliminares.....	60
5.2	Parámetros de operación del método cromatográfico.....	61
5.3	Observaciones de los recobros .....	66
6.	CONCLUSIONES.....	68
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	69

## 1. INTRODUCCIÓN

En la comercialización de productos farmacéuticos es necesario asegurar que éstos sean seguros, puros y efectivos, y así lograr que el consumidor tenga el efecto terapéutico esperado. Es por tanto que la industria farmacéutica debe cumplir con los criterios de calidad que cada producto requiere. Entre ellos, la pureza del producto; una característica que debe estar presente desde la adquisición de insumos hasta la fabricación y comercialización del mismo.

La producción, generalmente, requiere de un gran control, pues en la industria, el equipo de fabricación se utiliza para producir diversos productos que contienen diferentes principios activos, y la contaminación cruzada debe ser evitada para asegurar tal característica. Por esta razón la limpieza de las superficies que están directa e indirectamente en contacto con el producto es de suma importancia. Así la validación de limpieza es una herramienta que asegura que un proceso no tiene activo o detergente alguno, procedente de un proceso de fabricación anterior al producto actual.

En este trabajo se transfiere y valida un método analítico que permite la determinación de trazas de Nistatina por Cromatografía de Líquidos de Alto Desempeño, en superficies de equipo de acero inoxidable, y se adecúa para utilizarlo en superficies de pared, piso y ventanas, posterior a un proceso de limpieza del área.

La validación de limpieza permitirá a la empresa en cuestión, principalmente asegurar la calidad de sus productos, aumentar la competitividad y a la vez cumplir con el requerimiento oficial nacional e internacional, en cuestión de exportación.

Este trabajo se desarrolla de acuerdo a las regulaciones vigentes, tanto oficiales como internas, y a las normas relacionadas del país destino del producto, además de considerar fuentes bibliográficas que apoyen el desarrollo del método.

Posteriormente se realizan pruebas para llevar a cabo un protocolo de validación, que reditúe resultados que estadísticamente determinen el cumplimiento de los criterios de aceptación y se genere un reporte de validación.

El desarrollo está principalmente enfocado a la limpieza de agentes químicos sobre superficies y el aspecto microbiológico, y la detección de detergentes no se abordan en este trabajo.

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 Calidad y validación

La industria farmacéutica es un sector que siempre ha tenido gran rigor regulatorio por ser un tema de salud pública, además de permanecer en mejora continua. En México se tiene un ambiente sanitario regulado tanto por instituciones nacionales (SSA) como internacionales (OMS, FDA, etc.) encargados de monitorear y mejorar la calidad de los productos farmacéuticos en el país.

La calidad es un objetivo dependiente de un sistema farmacéutico regulado, para asegurar la efectividad, pureza e inocuidad de sus productos. Entre todos estos factores se encuentran los insumos, los procesos de fabricación, y la aprobación del producto, que necesitan de una regulación estricta y que por medio de la documentación expresen que su fabricación ha sido ejecutada de manera responsable y eficaz, y por consiguiente el fabricante cumpla con el requisito de calidad para comercializar.

#### 2.1.1 Definición y objetivos

Calidad es definida como el conjunto de propiedades inherentes a algo, que permiten juzgar su valor. Este concepto definido en parte por la validación. La Real Academia Española <sup>[17]</sup> define validación como “la firmeza, fuerza, seguridad o subsistencia de algún acto”, y esto aplicado a los procesos de producción es “la evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtiene un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas”, de acuerdo a la NOM-059-SSA1-2006.

Esta misma especifica que “Los fabricantes de medicamentos deben determinar las actividades de validación que son necesarias para demostrar el control de los aspectos críticos de sus operaciones particulares con un enfoque de análisis de riesgos” además de que “Los proveedores, las instalaciones, equipos, sistemas críticos y computacionales que impacten en la calidad del producto, deben estar calificados y los métodos analíticos, de limpieza y de producción y acondicionamiento, deben validarse al inicio de la operación y terminados antes de la liberación de un producto”<sup>[3]</sup>.

Esto establece que el equipo de fabricación debe por tanto ser limpiado apropiadamente para eliminar residuos de producto, residuos de limpieza y microbios previamente a la fabricación. De este modo se previene el riesgo de contaminación cruzada al validar los métodos de limpieza y los métodos analíticos desarrollados que la evalúan. En consecuencia es importante establecer los límites del método, la selección de técnicas apropiadas y el método de detección.

### 2.1.1 Tipos de Validación

Existen varios tipos de validación, cada uno de ellos parte de diferentes circunstancias y/o antecedentes<sup>[12,18]</sup>:

**Validación retrospectiva:** Es la validación de un producto que se encuentra ya comercializado, y no cuenta con validación previa. Se basa en antecedentes históricos del producto, obtenidos a partir de los registros de producción y control de calidad.

**Validación prospectiva:** Es la validación hecha previa a la distribución ya sea de un nuevo producto, o de un producto hecho bajo un proceso de producción vigilado. La validación se completa y los resultados se aprueban previamente a la liberación del producto.

**Validación concurrente:** Es aquella que se realiza durante la fabricación de rutina. Su aplicación es útil en productos existentes que no tienen un gran historial y en productos nuevos en sus primeros lotes de fabricación.

**Revalidación:** Se hace para evaluar un cambio en equipos, empaque, procedimientos operativos de formulación, o proceso que pueda impactar en la seguridad, eficacia o potencia del producto. Es importante determinar un programa de revalidación para equipo crítico para mantenerlo validado.

## **2.1.2 Validación de métodos analíticos**

### **2.1.3 Definición:**

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio que las características de desempeño del método cumplen con los requerimientos planteados para su uso.

La validación de estos métodos es importante y se debe tener en cuenta los requerimientos y las opciones con las que se cuenta para hacer un desarrollo óptimo. A pesar de que la validación es un requerimiento oficial, la práctica real de las actividades de validación su aplicación es amplia y en consecuencia, las prácticas difieren mucho entre organizaciones <sup>[11]</sup>.

### **2.1.4 Porqué validar los métodos**

Existen varias razones por las que se debe validar los procesos o métodos en la industria, entre ellas; que la validación es un requerimiento oficial, es parte de las buenas prácticas, además de una necesidad para el control de calidad de modo que la gestión de ésta dentro de la empresa pueda asegurar que los métodos analíticos que son utilizados por el laboratorio para liberar los productos, estén validados adecuadamente y los productos sean seguros para su consumo humano. El Código de Regulaciones Federales (CFR, Estados Unidos de Norteamérica, 21CFR211.165), establece que “la exactitud, sensibilidad, especificidad, y reproducibilidad de los métodos empleados por la empresa deben estar establecidos y documentados”.

Por otro lado, la validación trae consigo beneficios a la empresa. La validación permite un rápido arranque de equipo nuevo, mantenimiento sencillo, fácil escalamiento y mejora en la automatización del proceso, así, se necesitará menos pruebas en proceso y en producto terminado, y se tendrá menos quejas relacionadas a fallas de proceso, además de una reducción de rechazos y retrabajos. En consecuencia, se tiene una reducción de costos de utilidades y un

incremento del rendimiento, ambos grandes objetivos de la empresa. Contar con estas características la hace más competitiva <sup>[11,12]</sup>.

### **2.1.5 Características de la validación de métodos analíticos**

Las agencias gubernamentales piden información exacta y detallada además de datos registrados en archivos actualizados que documenten las operaciones relacionadas a manufactura y las pruebas.

Desde una perspectiva farmacéutica, los analistas necesitan asegurar la exactitud y la confiabilidad de los datos generados por los métodos de análisis. Existen elementos y controles fundamentales que aseguran la calidad de los datos analíticos a reportar <sup>[10]</sup>:

- Analistas entrenados y calificados
- Métodos desarrollados adecuadamente y robustos
- Metodología validada y correcta adecuabilidad del sistema
- Estándares de referencia certificados
- Transferencias de métodos efectivas
- Instrumentos de laboratorio calibrados y calificados (IQ,OQ,PQ)
- Exacta documentación y reporte de datos

Estos elementos se correlacionan para asegurar la calidad de los datos reportados <sup>[4,10,11,14]</sup>.

#### **2.1.5.1 Exactitud**

Se define como el grado de concordancia entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado. Para un fármaco la exactitud puede ser definida al aplicarse un método analítico a un analito de pureza conocida (por ejemplo un estándar). Para un medicamento, la exactitud se determina aplicando el método analítico a muestras sintéticas de los componentes del medicamento a las cuales se han agregado cantidades conocidas del analito dentro del rango del procedimiento <sup>[2]</sup>.

### **2.1.5.2 Precisión**

Se define como precisión el grado de concordancia de una serie de mediciones de múltiples muestreos de la misma muestra bajo condiciones establecidas. Usualmente se busca precisión en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

#### **Repetibilidad:**

Es la medición de la precisión bajo las mismas condiciones de operación dentro de un corto periodo de tiempo, es decir, bajo condiciones normales de operación del método analítico con los mismos equipos. También es denominado precisión intraensayo.

#### **Precisión intermedia:**

Es la variación dentro del mismo laboratorio, ya sea diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

#### **Reproducibilidad:**

Mide la precisión entre laboratorios. Este parámetro se considera en la estandarización de un procedimiento analítico (inclusión de métodos en farmacopeas y transferencias entre laboratorios).

### **2.1.5.3 Especificidad**

Especificidad es la habilidad para evaluar inequívocamente un analito en presencia de componentes que se esperan estén presentes. En las pruebas de identidad, los compuestos de estructura parecida que puedan estar presentes deben ser discriminados uno de otro.

### **2.1.5.4 Límite de Detección (LOD)**

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado con un valor exacto bajo las condiciones

experimentales establecidas. El LOD se expresa comúnmente como concentración en la muestra <sup>[2,3]</sup>

#### **2.1.5.5 Límite de Cuantificación (LOQ)**

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con adecuada precisión y exactitud.

#### **2.1.5.6 Linealidad**

Es la habilidad (en un rango dado) para obtener resultados de pruebas que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra.

#### **2.1.5.7 Rango**

Es el intervalo entre las concentración (cantidad) superior e inferior de del analito en la muestra (incluyendo estas concentraciones) para las cuales ha demostrado que el método analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

#### **2.1.5.8 Robustez**

Es la medida de su capacidad para mantenerse inalterado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee un índice de su confiabilidad durante su uso normal

#### **2.1.5.9 Estabilidad**

Es la medida de la capacidad de las soluciones estándares de trabajo y las muestras para permanecer inalteradas y sin impurezas a condiciones ambiente, ambiente protegido de luz, y en refrigeración. Esta capacidad es evaluada contra una solución estándar de trabajo recién preparada.

### 2.1.6 Etapas de la validación de un método analítico

La validación de un método analítico no se lleva a cabo solo una vez, sino este método se desarrolla y se valida para utilizarlo en la evaluación de muestras del activo o del producto en desarrollo o producción, hasta que el método final sea adecuado para el producto a comercializar. En caso de que en la fabricación del producto exista algún cambio que tenga el poder de modificar el perfil analítico del activo, el método analítico necesitará revalidarse para asegurar que todavía sea adecuado para evaluarlo <sup>[11]</sup>.

El proceso típico que se sigue se menciona cronológicamente <sup>[10]</sup>

- 1.- Planear y decidir las pruebas en la validación del método
- 2.-Escribir y aprobar el protocolo de validación del método
- 3.- Llevar a cabo el protocolo de validación del método
- 4.-Analizar la información de la validación
- 5.-Reportar la validación analítica del método
- 6.- Finalizar el Procedimiento del método analítico

Las pruebas para la validación del método se deben planear bien y establecerlos para asegurar el uso eficiente de tiempos y de los recursos durante la validación del método. La mejor forma de asegurar un estudio de validación bien planeado es escribiendo un protocolo de validación que se revisa y se aprueba por las personas apropiadas (Por ejemplo, jefatura de laboratorio y aseguramiento de la calidad).

Los parámetros de validación que se evaluarán dependen del tipo de método que se validará. Los métodos analíticos que se validan comúnmente se pueden clasificar en tres principales categorías: Identificación, detección de impurezas, y ensayos<sup>[11]</sup>.

La siguiente tabla es tomada de la guía Q2A de la ICH <sup>[6]</sup>, y enlista algunos de los parámetros de validación recomendados para métodos de identificación, impurezas y ensayo.

Tipo de procedimiento analítico	Identificación	Pruebas para impurezas		Ensayo: Disolución , Contenido/Potencia
		Cuantificación	Límite	
Exactitud	-	+	-	+
Precisión				
Repetibilidad	-	+	-	+
Precisión intermedia	-	<sup>a</sup> +	-	<sup>a</sup> +
Especificidad <sup>b</sup>	+	+	+	+
Límite de detección (LOD)	-	<sup>c</sup> -	+	-
Límite de cuantificación (LOQ)	-	+	-	-
Linealidad	-	+	-	+
Rango	-	+	-	+
Estabilidad de la solución	-	+	-	+
<sup>a</sup> La precisión intermedia no es necesaria en casos donde ya se lleva a cabo la reproducibilidad <sup>b</sup> La falta de especificidad de un procedimiento analítico se puede compensar con un procedimiento secundario <sup>c</sup> Puede que no sea necesario en algunos casos "-."Significa que esta característica no es comúnmente validada "+."Significa que esta característica es comúnmente validada				

Tabla 2.1: Parámetros de validación necesarios para Identificación, impurezas y ensayo

Normalmente un protocolo de validación tiene como mínimo los siguientes puntos<sup>[10,11,13]</sup>:

- Objetivo del protocolo
- Parámetros de validación que serán evaluados
- Criterios de aceptación para todos los parámetros evaluados
- Detalles de los experimentos que se realizarán
- Borrador del procedimiento analítico

Los datos de la validación se deben analizar tan pronto se obtengan y se procesen para asegurar un buen flujo de la información. Si se detecta un error experimental, se deberá resolver tan pronto sea posible para reducir el impacto que pueda tener en experimentos posteriores. El análisis de los datos incluye examinación visual de los valores numéricos de los datos y los cromatogramas seguidos de un tratamiento estadístico en caso de ser necesario.

Una vez terminada la experimentación, todos los datos se recopilan en un reporte de validación detallado, el cual dictará el éxito o fallo de la validación. De acuerdo a las estrategias de la empresa también se debe generar un resumen de los datos de la validación. Una ejecución satisfactoria de la validación conlleva a un procedimiento analítico final que puede ser utilizado por el laboratorio para analizar futuros análisis del principio activo o de los medicamentos.

La información mínima que debe incluir el procedimiento final es <sup>[11,13]</sup>:

- Explicación del procedimiento analítico y descripción de la habilidad del método. Si es revalidación se debe incluir las ventajas y mejoras que ofrece la nueva versión.
- Propuesta del método analítico: Contiene una descripción completa del procedimiento a gran detalle para aumentar la posibilidad de su repetibilidad por medio de los analistas. El escrito debe incluir todos los parámetros operacionales importantes e instrucciones específicas, por ejemplo, la preparación de reactivos, pruebas de adecuabilidad, precauciones, y fórmulas explícitas para el cálculo de los resultados de la prueba.
- Lista de impurezas permitidas y sus niveles en un ensayo de impurezas
- Datos de la validación: Se incluye ya sea un grupo detallado de datos o un resumen de los mismos.
- Historial de revisiones
- Firma del autor, revisor, jefe, y aseguramiento de la calidad

### **Verificación de métodos farmacopéicos**

La FDA en su BPF's en el CFR21 211.194(a)(2), establece que aquellos que utilicen los métodos analíticos incluidos en la USP no necesitan validar la exactitud y confiabilidad de los mismos, pero deben verificar la adecuabilidad del método en las condiciones reales de uso.

La verificación consiste en evaluar algunas características de su validación analítica para generar información relevante apropiada en vez de repetir el proceso de validación para el producto comercial. La guía incluida en la USP para tal propósito, es aplicable a pruebas como titulaciones, procedimientos cromatográficos (relacionados a ensayo, pruebas límite) y pruebas espectroscópicas. Las pruebas generales (por ejemplo agua, metales pesados, residuo a la ignición) comúnmente no requieren verificación.

Del mismo modo, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS, entidad regulatoria en México), dicta que no es necesario validar los métodos farmacopéicos, solo se debe demostrar su adecuabilidad, y en caso de no existir método farmacopéico para el producto comercial, se deberá cumplir con las guías de validación oficiales para metodologías analíticas desarrolladas por el fabricante, y en su caso cuando se modifiquen las condiciones o características del método indicado en la monografía farmacopéica.

### **2.1.7 Revalidación**

Existen situaciones en las que un método necesita ser replanteado y revalidado. Algunas de ellas son cuando<sup>[10,11,13]</sup>:

- Se introducen cambios significativos durante la optimización del proceso de síntesis del fármaco
- Se encuentra una impureza que hace ineficiente en su especificidad al método
- Existe un cambio en la composición de los excipientes que cambie el perfil de impurezas del producto.
- Existe un cambio en equipos o proveedores de insumos críticos del fármaco o del medicamento y conlleven a un cambio potencial a su perfil de degradación.

### **Transferencia de métodos analíticos**

Una vez que un método ha sido desarrollado y validado, se puede transferir a cada sitio que pretenda utilizar el método, comúnmente la transferencia del método se realiza entre el grupo desarrollador y validador del método y el grupo

de Control de calidad (Quality Control, QC) que utilizará el método para liberar el producto terminado. Así como en la validación, la transferencia del método de ejecuta bajo el control de un protocolo que detalle los pasos necesarios para su estudio.

Para cada prueba se necesita analizar las muestras con réplicas. Los criterios de aceptación se basan en el método propuesto y las características de validación. Esto puede estimarse con la ayuda de un estudio Gage R&R (GRR), en caso contrario se puede recurrir a la ecuación de Horwitz para relacionar la repetibilidad y reproducibilidad del método. Comúnmente la diferencia en los valores promedio de ensayo debe ser menor del 2% para métodos de sustancias activas, y la precisión debe ser menor del 1% de la desviación estándar relativa (DER) en cada laboratorio. Para cada medicamento, estos límites son de 3.0 y 2.0 % para la diferencia del ensayo promedio y la precisión para cada laboratorio respectivamente. Las impurezas se consideran usualmente a un nivel de 0.5% y la diferencia permitida entre laboratorios debe ser menor del 0.2% con una precisión intralaboratorio menor del 15% de DER en cada laboratorio.

## **2.2 Validación de limpieza**

En la fabricación de medicamentos los equipos de producción son un punto clave que pueden comprometer potencialmente la seguridad, eficacia o calidad de los lotes subsecuentes producidos dentro del equipo, es por ello que los equipos de manufactura deben limpiarse apropiadamente para asegurar la ausencia de residuos del último producto fabricado, agentes de limpieza y microbios previos a una nueva manufactura. En consecuencia, la validación de limpieza es uno de los aspectos más importantes en la producción de medicamentos, pues con ella se previene la contaminación cruzada. En el desarrollo y validación se establecen límites y se seleccionan las técnicas y métodos de detección apropiado para confirmar que el proceso de limpieza es suficiente para prevenir riesgos.

## **2.2.1 Definición y objetivos** <sup>[1,11]</sup>

La validación de limpieza se define como el proceso de proveer evidencia documentada de que los métodos de limpieza empleados en un instalación controlan consistentemente residuos potenciales de producto (incluyendo intermediarios e impurezas), agentes de limpieza, y material extraño hacia un producto subsecuente a un nivel, es cual esté bajo niveles predeterminados <sup>[11]</sup>.

Las razones detrás de la validación de los procedimientos de limpieza son afirmar la seguridad y la pureza del producto (requerimiento del consumidor), es un requerimiento regulatorio en la manufactura de medicamentos, y asegura la calidad del proceso desde un punto de vista de control interno y regulatorio.

Los procedimientos de limpieza inapropiados generarán lotes de baja calidad debido al riesgo de presencia de un número de contaminantes, tales como precursores del activo, productos de degradación, solventes y otros materiales empleados durante el proceso de manufactura, microorganismos, agentes de limpieza y lubricantes.

## **2.2.2 Tipos de contaminación** <sup>[5]</sup>

### **2.2.2.1 Química**

Contaminación cruzada con ingredientes activos y/o con materiales o compuestos imprevistos (impurezas y compuestos de degradación).

No es aceptable la contaminación de un lote con niveles residuales significativos del ingrediente activo de un lote previo, ni de los materiales inertes utilizados en los medicamentos a pesar de que sean generalmente declarados como seguros o que muestran inocuidad en su consumo humano. El uso rutinario, mantenimiento y limpieza del equipo proveen la contaminación potencial con elementos como aditamentos, lubricantes, agentes de limpieza y herramientas de limpieza como brochas y paños.

Es importante evitar exponer a los consumidores a contaminantes no previstos que puedan generarles interacciones clínicamente potenciales y sinérgicas.

### **2.2.2.2 Microbiana**

Carga microbiana (bacterias, hongos, virus, patógenos, pirógenos, etc.) proveniente de fuentes que impactan al proceso (materia prima, granel, agua, aire, envase primario, equipo de fabricación, y personal).

La contaminación microbiana se determina de acuerdo al tipo de proceso que se monitorea o limpia (Fabricación de formas farmacéuticas estériles o no estériles). Para formas farmacéuticas estériles se busca que no tengan ningún tipo de carga microbiana. Para forma farmacéuticas no estériles se permite un máximo de carga microbiana, y la ausencia total de patógenos.

#### **Contaminación de superficies farmacéuticas.**

La contaminación de superficies es un tema importante en muchas áreas tecnológicas como la farmacéutica. En esta área se buscan formas de monitorear y caracterizar la contaminación de las superficies y también remover meticulosamente tal suciedad de una gran variedad de superficies. Los métodos de limpieza varían de acuerdo al tipo de contaminación esperada y el tipo de superficie de donde se remueve.

#### **Clasificación de contaminantes** <sup>[5,19]</sup>

La contaminación se define como una materia extraña indeseable que está presente en una superficie. La contaminación se puede clasificar en tres categorías diferentes:

- 1.-Partículas: Materia extraña presente en la superficie como un objeto físico. Algunos ejemplos son polvos, cabello, microfragmentos, y fibras.
- 2.-Capas finas (Orgánica e inorgánica): También llamada contaminación molecular, está presente en la superficie en forma de una fina capa que cubre completa o parcialmente la superficie. Algunos ejemplos son grasa de la piel, grasas, aceites, residuos de tensoactivos o residuos químicos, óxidos y otras capas indeseables.

- 3.-Microbiológica o biológica: puede estar presente en las superficies en forma de partículas, o delgadas capas o una combinación de ambas que están constituidas generalmente de organismos vivos indeseables. Algunos ejemplos son esporas, bacilos, cultivos orgánicos y biocapas. Esta contaminación se da generalmente a partir del ambiente o residuos de los procesos.

### **2.2.3 Superficies**

Es de gran importancia el material que está en contacto con el producto al momento de su fabricación, ya sea de modo directo indirecto. El material que está en contacto directo con los productos es el equipo de fabricación, al cual se le exige que sea casi inerte para evitar liberación de material del equipo de fabricación a las formas farmacéuticas. El material más ampliamente utilizado para este fin es el acero inoxidable que existe en gran variedad, entre ellos el de grado farmacéutico, cuya propiedad evita la contaminación por la higiene que representa tal material.

#### **Acero inoxidable en plantas farmacéuticas y equipos <sup>[24]</sup>**

Las aplicaciones farmacéuticas, demandan en común con los alimentos y bebidas, que los materiales de construcción mantengan la integridad de la estructura (es decir, resistencia a la corrosión y suficientemente robustas para soportar el entorno específico) y por tanto se requieren superficies inertes (liberación insignificante de contaminantes en el producto).

Los aceros inoxidables se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica debido a su resistencia a la corrosión, son superficies inertes (fácil de limpiar) y de fabricación sencilla. Aunque el grado 1.4401 (AISI 316) y sus derivados son los aceros inoxidables más ampliamente utilizados en plantas farmacéuticas y son considerados por muchos como el estándar de la industria, los materiales para cada aplicación se seleccionan basándose en su resistencia a la corrosión en un entorno de servicio específico. La selección de un grado adecuado de acero inoxidable también debe incluir la consideración de los agentes de limpieza y

régimen de limpieza utilizado en la planta. Además, también la operación de la planta puede influir en la elección del material (ya sea continuo con un sistema "*clean in place*" o una operación por lotes con paradas para su limpieza).

El acero inoxidable es el término utilizado para describir una familia extremadamente versátil de materiales de ingeniería, que se seleccionan principalmente por sus propiedades de resistencia a la corrosión y su resistencia al calor.

Todos los aceros inoxidables contienen principalmente hierro y un mínimo de 10,5% de cromo. En este nivel, el cromo reacciona con el oxígeno y la humedad del ambiente para formar una película de óxido protectora, adherente y coherente, que envuelve toda la superficie del material. Esta película de óxido (conocido como la capa límite o pasiva) es muy delgada (2-3 nanómetros). La capa pasiva de los aceros inoxidables exhibe una propiedad verdaderamente notable: cuando se daña (por ejemplo, abrasión), se autorrepara dado que el cromo en el acero reacciona rápidamente con oxígeno y la humedad en el medio ambiente para reformar la capa de óxido.

El aumento del contenido de cromo más allá del mínimo de 10,5% confiere aún mayor resistencia a la corrosión. La resistencia a la corrosión puede mejorarse aún más, por la adición de 8% o más de níquel. También la presencia de molibdeno aumenta aún más la resistencia a la corrosión (resistencia en particular, a la corrosión por picaduras), mientras que el nitrógeno aumenta la resistencia mecánica y aumenta la resistencia a picaduras.

### **Categorías de los aceros inoxidables**

El árbol familiar del acero inoxidable tiene varias ramas, que pueden ser diferenciados en una variedad de formas, por ejemplo, en términos de las áreas de aplicación, por los elementos de aleación utilizados en su producción, o, tal vez la forma más precisa posible, por las fases metalúrgicas presentes en sus estructuras microscópicas:

- Ferrítica
- Martensítica (incluyendo la precipitación con aceros de endurecimiento)
- Austenítica
- Aceros dúplex, formados por mezcla de ferrita y austenita

En cada uno de estos grupos, hay varios "grados" de acero inoxidable, que se definen de acuerdo con sus rangos de composición en estándares europeos (y otros, por ejemplo, estadounidenses), y dentro del rango especificado, el grado de acero inoxidable mostrará todas las propiedades deseadas (por ejemplo resistencia a la corrosión y / o resistencia al calor y / o maquinabilidad).

### **Aceros inoxidables austeníticos**

Son por ejemplo, los grados 1.4301 y 1.4833, los cuales consisten en cromo (16-26%), níquel (6-12%) y hierro. Se pueden adicionar o modificar otros elementos de aleación (por ejemplo, molibdeno) de acuerdo con las propiedades deseadas para producir grados derivados que se definen en las normas (por ejemplo, 1,4404). El grupo austenítico contiene más grados, que se utilizan en grandes cantidades, que cualquier otra categoría de acero inoxidable. Los aceros inoxidables austeníticos presentan una resistencia a la corrosión superior a los aceros inoxidables ferrítico y martensíticos. El comportamiento de la corrosión se puede variar para adaptarse a una amplia gama de entornos de servicios por medio de un cuidadoso ajuste de la aleación, por ejemplo, el contenido de carbono o molibdeno. En resumen, presentan ventajas para su manejo y aplicación en ambientes de alta exigencia higiénica.

Ejemplos típicos de aplicaciones de acero inoxidable en la producción farmacéutica son los tanques de transformación y reacción, tanques de almacenaje, bombas, tuberías, intercambiadores de calor, unidades de lavado, grifos y válvulas.

## **Superficies de contacto indirecto**

Las superficies que están en contacto indirecto con el producto son principalmente aquellas que cubren integralmente la instalación, específicamente hablando de los pisos y las paredes, y ventanas si existen.

### **Paredes, techos y pisos (acabados epóxicos) <sup>[25]</sup>**

Las paredes y plafones, son superficies que cuentan con un acabado con resistencia química y mecánica, que proveen limpieza y sanidad con el objetivo de evitar la acumulación de contaminación, y hasta un fin decorativo.

El acabado de estas superficies se realiza generalmente con pintura epóxica, que se tiene en dos envases, una con la pintura epóxica y otro con un catalizador o endurecedor a base de amina o poliamidas. El secado se lleva a cabo al evaporarse el disolvente, simultáneamente con la reticulación de la resina. Se aplica con dispersión de aire o rodillos de felpa. Este tipo de acabado genera una superficie ligeramente rugosa y opaca. Sus ventajas son la resistencia química, mecánica y física. Su desventaja es la inestabilidad del color.

Los pisos al igual que los muros, cuentan con acabado de resina epóxica, libre de solventes, que dada su propiedad autonivelante, crea una superficie con un mínimo de imperfecciones de aspecto liso y reflejante. El acabado epóxico se debe al polímero que endurece gradualmente con un agente catalizador, comúnmente una reacción entre epiclorohidrina y bisfenol-A. Después de la aplicación ocurre el curado o reticulación a temperatura ambiente, durante ese proceso ocurre la gelificación, que es la transición que toma lugar durante la formación de la red polimérica y corresponde a la generación de una estructura macromolecular gigante a través del medio de reacción. Se da por una sucesión de reacciones elementales entre sitios reactivos creando nuevos enlaces covalentes entre pares de grupos funcionales. Macroscópicamente esta transición se traduce en un cambio de forma líquida a sólido. Esta estructura altamente reticulada es la razón de propiedades como la buena resistencia mecánica,

resistencia a la humedad, resistencia química y resistencia a temperaturas elevadas.

## **Ventanas** <sup>[26]</sup>

Las ventanas de vidrio, a pesar de ser un material que no posee un arreglo molecular cristalino, cumple con ser una superficie altamente lisa y del mismo modo permite su eficiente limpieza.

El tipo de vidrio más comúnmente utilizado para ventanas y envases de vidrio es el soda-cal, que se prepara por fusión de carbonato de sodio (soda), Cal (Carbonatos de calcio), dolomita (Carbonato de calcio-magnesio), dióxido de silicio y alúmina (óxido de aluminio). En su fabricación la fusión genera superficies con mínimas irregularidades.

El interior de un vidrio de sosa-cal es una red de moléculas de dióxido de silicio en el que se encuentran alojados iones de calcio y sodio. El contenido de agua aumenta desde el interior de esta estructura hacia la superficie dado que el vidrio atrae agua del aire.

El agua es capaz de romper algunas de las conexiones en la red de dióxido de silicio y difundirse más lejos de la superficie y de microgrietas en la red molecular del vidrio. El contenido de sodio superficial puede ser diferente del interno, porque el sodio se desprende bajo las condiciones del tratamiento del vidrio con calor. Donde termina la red de dióxido de silicio, la red termina con moléculas de agua absorbidas. Esta película de agua tiene encima una película de agua físicamente adsorbida, que atrapa adsorbatos de la atmósfera, como moléculas orgánicas y partículas de suciedad.

## **Adhesión a superficies** <sup>[27]</sup>

De modo general, la limpieza de estas superficies es de gran importancia pues la integridad de los materiales frente a la abrasión, desgaste, quebramiento o corrosión determinan también la efectividad de su limpieza. La rugosidad de estas superficies es también un punto clave para lograr tal objetivo.

Cuando una partícula sólida entra en contacto físico con cualquier otra partícula sólida o una superficie sólida, las fuerzas entre ellas son principalmente de atracción y resulta en la adherencia de las partículas entre sí o a la superficie sólida. Cuanto más fino es el tamaño de las partículas, las fuerzas de adhesión involucradas se vuelven más significativas y las partículas se vuelven más difíciles de remover. En resumen, las fuerzas de adhesión principales son proporcionales al diámetro de partícula.

Después de que se establece el contacto físico entre las partículas y una superficie sólida, se considera que las fuerzas de atracción predominantes entre las partículas adheridas son las fuerzas electrostáticas y de van der Waals. Otras fuerzas de interfase tales como puentes líquidos (o película líquida), la repulsión de doble capa y enlaces químicos pueden desempeñar papeles importantes en circunstancias específicas. Con la presencia común de humedad en el medio ambiente, es usual tener un poco de humedad adsorbida en la superficie de la mayoría de los materiales. En la interfase donde dos materiales diferentes entran en contacto, un puente líquido resulta en una fuerza de atracción debido a la tensión superficial del líquido.

Otro factor importante en la adhesión de partículas es la rugosidad de la superficie sólida, esto afecta la contribución de las fuerzas de van der Waals a la adhesión. Esto está ligado al tamaño de las asperezas. Las asperezas menores al tamaño de partícula reducen dicha contribución de fuerzas electrostáticas y por tanto debilitan la deposición, en cambio las asperezas mayores la favorecen. Por tanto

las asperezas menores dan la ventaja de una fácil remoción de partículas que contactan la superficie.

#### **2.2.4 Determinación de límites de aceptación** [2,7,8,9,16]

Las unidades utilizadas para medir la contaminación son comúnmente en producto fabricado en el equipo recién limpiado son ppm ( $\mu\text{g/g}$ ), para contaminación de superficie son  $\mu\text{g/cm}^2$  y para la muestra analizada son  $\mu\text{g}$  o  $\mu\text{g/g}$ . Los límites de área por superficie son unidades diferentes y no se deben comparar directamente sin datos como el tamaño del lote y área de superficie del equipo. Los límites en el producto fabricado deben tener las mismas unidades que las muestras analizadas, pero tampoco son comparables sin datos como el área muestreada y el factor de recuperación de hisopo.

Oficialmente se citan algunos trabajos para tomarse como criterios de referencia propuestos para la determinación del límite:

- a) después de la limpieza el equipo se encuentra visiblemente limpio,
- b) cualquier agente activo se encontrará presente en un producto fabricado subsecuentemente a un nivel máximo de 10 ppm y
- c) cualquier agente activo está presente en un producto fabricado subsecuentemente a un nivel máximo de 1/1000 de la dosis mínima diaria (DMD) del agente activo en una dosis máxima diaria del mismo producto.

Se sabe que aunque no están establecidos estos criterios oficialmente por la FDA, han sido usados ampliamente dentro de la Industria Farmacéutica para la determinación de niveles aceptables de residuos químicos.

### Límite en un producto subsecuente:

Para el cálculo del límite del agente activo en cualquier producto fabricado posteriormente, la información necesaria es la dosis mínima diaria (DMD) del activo que se intenta remover (Producto A), y la dosis máxima diaria del producto fabricado posteriormente (Producto B). El límite (L1) se expresa:

$$L1 = \frac{(0.001)(\text{dosis mínima diaria de activo en Prod. A})}{\text{dosis máxima diaria de Prod. B}} = x \mu\text{g/ml}$$

Donde:

0.001: es el factor de seguridad para dosis orales, ó

0.0001 para productos parenterales (valores sugeridos).

Para el producto A:

$$\text{dosis mínima diaria líquidos} = (\text{Conc. Activ o } \mu\text{g/ml})(\text{Dosis ml/dosis})(\text{No. mín. dosis/día})$$

$$\text{dosis máxima diaria sólidos, polvos} = (\text{Conc. Activ o } \mu\text{g/g})(\text{Dosis g/dosis})(\text{No. mín. dosis/día})$$

Y para el producto B:

$$\text{dosis máxima diaria líquidos} = (\text{Dosis ml/dosis})(\text{No. máx. dosis/día})$$

$$\text{dosis mínima diaria sólidos, polvos} = (\text{Dosis g/dosis})(\text{No. máx. dosis/día})$$

El cálculo del producto posterior es independiente de qué activo se trata y a qué concentración se encuentra.

El valor de  $x \mu\text{g/ml}$  (ppm) de límite de residuo es independiente del tamaño del granel y del área superficial del equipo, y se compara contra el valor de 10 ppm predeterminado y el valor menor utilizado para cálculos posteriores.

El valor de 10 ppm es un valor arbitrario y no justificable científicamente, y se utiliza solo si es menor que el valor de límite L1. Aplicándose adecuadamente resulta ser un límite menor que lo calculado científicamente. Por tanto que resulta en un valor aún menor que el límite L1, no se puede rechazar como una herramienta inválida.

## Límite por área de superficie

En seguida se calcula el nivel de contaminación del ingrediente activo por superficie de área. Este límite (L2, en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) se calcula como:

$$L2 = \frac{(L1)(\text{Tamaño del lote Prod.B})(1000)}{\text{área de superficie compartida del equipo}}$$

Donde:

- L1 es el límite en un producto subsecuente,
- 1000 es un factor de conversión para obtener ppm (límite en el lote del prod. B) y convertir kg a  $\mu\text{g}$  (para el lote del prod. B),
- el tamaño del lote del producto b se expresa en kg y la superficie compartida del equipo en  $\text{cm}^2$ .

Este cálculo considera que el residuo se encuentra distribuido uniformemente por toda la superficie del equipo, se considera que esto no ocurre normalmente, sin embargo se toma como el peor caso. Se recomienda calcular el límite de área de superficie para cada producto que se piense fabricar en seguida del producto A, y el límite de residuo para validación de limpieza se debe establecer al menor de los límites, así el equipo de planeación tendrá flexibilidad de fabricar productos en cualquier orden.

## Límite en la muestra analizada

Para el cálculo de este límite, los parámetros se enfocan en las variables involucradas en el muestreo con hisopo. El cálculo es como sigue:

$$L3 = \frac{(L2)(\text{área de superficie muestreada})}{\text{cantidad de solvente de extracción}}$$

Donde:

- L2 es el límite por área de superficie expresada en  $\mu\text{g}/\text{g}$  o ppm,
- el área de superficie se expresa en  $\text{cm}^2$ , y
- la cantidad de solvente en la que se extrae el hisopo en gramos.

El cálculo de este límite debe corregirse con un factor de recuperación con hisopo. Hay dos formas:

- a) El factor de recuperación se puede incluir en el cálculo analítico real.
- b) El factor de recuperación se incluye en el numerador de la ecuación para la determinación de este límite L3.

Una razón por la que el límite L1 sea menor que el límite L3, es porque el primero refleja un residuo que se encuentra distribuido uniformemente en un lote, mientras que el segundo refleja el residuo concentrado en el solvente de extracción. Comúnmente se tiene que el  $L1 < L2 < L3$ .

Otro punto de vista que toma en cuenta estos tres límites es el cálculo del Límite aceptable de residuo o LAR, que se calcula así:

$$\text{LAR ó L3(g/mL)} = \frac{(\text{FS})(\text{DDMín A})(\text{TLprodB})(\text{ASM})(10^9)}{(\text{DDMáxB})(\text{ACE})(\text{CCD})}$$

Donde:

- FS es el factor de seguridad (valores sugeridos)
  - 0.001: es el factor de seguridad para dosis orales, ó
  - 0.0001 para productos parenterales.
- DDMínA es la dosis diaria mínima del activo producto en el producto A,
- TLProdB es el tamaño del lote B,
- ASM es el área muestreada en el equipo,
- $10^9$  es el factor de conversión de gramos a microgramos,
- DDMáxB es la dosis diaria máxima del producto B,
- ACE es el área de superficie compartida en el equipo, y
- CDD es la cantidad constante de diluyente.

## Límite por toxicidad del residuo

Se utiliza para residuos que no se les conoce su dosis terapéutica o farmacológica como a los productos de degradación, excipientes y agentes de limpieza. Este límite se establece a partir del consumo aceptable diario (acceptable daily intake, ADI, por sus siglas en inglés), que toma en cuenta el efecto tóxico. Este se calcula así:

$$ADI(\text{mg/día}) = \frac{LD50(\text{mg/kg})}{F_{VA}} [W(\text{kg})]$$

Donde:

- W es el peso del cuerpo humano,
- LD50 es la dosis letal, y
- $F_{VA}$  es el factor de seguridad (relativo a la vía de administración), por un factor adicional FC (factor de conversión determinado a partir de un modelo animal, propuesto por *D.W. Layton*).

Otra forma de calcular el ADI es calculando el nivel no observado del efecto (No observable effect level, NOEL, por sus siglas en inglés):

$$NOEL = LD_{50} \times FC \quad \text{y} \quad ADI = NOEL \times W \times FS$$

En el que (FS) (DDMín A) del cálculo de LAR o L3 es equivalente con el cálculo de ADI, así:

$$LAR \text{ ó } L3(\text{g/mL}) = \frac{(ADI)(TLp\text{rodB})(ASM)(10^9)}{(DDM\text{áxB})(ACE)(CCD)}$$

En caso de utilizar este cálculo, se recomienda incluir el factor de recuperación del hisopo para fines de validación. También se puede establecer el ARL basado en el valor de 10ppm en residuos cuyo valor de ADI no puede ser establecido o es mayor de 1.0 mg/día y cuyos productos son fabricados en equipos de uso múltiple. Para residuos potentes el límite debe ser menor de 1 ppm

## **Límite por inspección visual**

Su ventaja es ser un método rápido, de bajo costo, además de que simplifica el proceso de validación al realizarse con criterios estrictos. Si una superficie está visualmente sucia, entonces los procedimientos de limpieza no son aceptables o están fuera de control.

Para desarrollar experimentalmente su utilización se deben tomar en cuenta factores como la potencia del residuo, la cantidad que es detectable visiblemente, la selección de las superficies adecuadas, la condiciones de inspección visual y entrenamiento del personal que la realizará, y las etapas del proceso en las que conviene utilizar este tipo de inspección. Por la naturaleza de esta inspección, es más seguro utilizarse en procesos de productos orales y no estériles. El nivel más alto al cual se considere que está visualmente limpio se establecerá como el nivel permisible para la limpieza de este residuo.

Si al calcular el L2, el valor es mayor que  $4\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (valor de diferencia aproximado entre limpieza y suciedad visual), o que el valor determinado del límite visualmente visible, se puede aceptar la limpieza visual como el único criterio de aceptación. Es decir, que si se aceptaran ambos valores, en consecuencia se estaría aceptando niveles de suciedad visibles con el límite L2.

Para el caso de residuos potentes donde el L2 es menor de  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , si la superficie está visualmente sucia, indicará falta de limpieza, y si está visualmente limpia no garantiza que el residuo esté en un nivel aceptable.

## **Límite basado en la sensibilidad del método analítico**

Se utiliza el Límite de detección (LOD) del método analítico como límite de residuo de limpieza. Es útil en casos donde la contaminación cruzada pueda tener consecuencias críticas. Sin embargo es responsabilidad del fabricante, pues involucra realizar limpiezas extremas, costosas e imprácticas. Para esta

consideración se deben revisar factores como la naturaleza y uso del producto subsecuente. Si el L3 es menor que el LOD, se busca otra técnica de análisis o instrumentos, o se modifican otros factores (como por ejemplo, volumen de inyección en análisis por HPLC), incluso influir en cálculo del L3 para incrementarlo modificando el muestreo y análisis del residuo.

### **Límite a partir de la capacidad del proceso de limpieza**

Se utiliza cuando se tienen resultados del control del procedimiento de limpieza y menores al valor límite L3, así establecer el LAR por debajo del L3. En caso de no contar con ello, se establece un proceso de limpieza que permita conocer su capacidad y logre resultados menores al L3.

Un proceso de limpieza validado y robusto (con suficientes datos analíticos) resulta útil para el monitoreo de rutina, y en dependencia del historial de los valores analíticos se determina un rango de alerta y otro para tomar medidas dentro del proceso, ambos menores al L3. Así se esperará contar siempre con resultados menores al rango de alerta. En caso de llegar a tener resultados en alerta, no se afectarán lotes involucrados que cumplan con el límite L3, además de que permitirá al fabricante ocuparse del control y la consistencia del proceso de limpieza.

### **Contaminación microbiológica**

Es una determinación compleja y difícil, además de no haber guías precisas al respecto. Para establecer límites hay que tener en cuenta la vía de administración, la naturaleza o tipo de microorganismo contaminante, por ejemplo *E. coli*, *Enterococcus* y *Pseudomonas sp.* son inaceptables. Los productos parenterales y oftalmológicos requieren controles más rigurosos en límites microbianos, incluso un límite para endotoxinas presentes en la superficie de los equipos de fabricación.

### 2.2.5 Técnicas de muestreo <sup>[1,2,9]</sup>

Las técnicas de muestreo son la forma en la que son recolectados los residuos de las superficies de los equipos, de modo que se puedan cuantificar, y cuyo objetivo es generar resultados analíticos que se puedan considerar como un dato representativo del completo o peor caso en el sistema (resultando en un estimado del límite superior del máximo residuo que pueda estar presente). Existen cuatro tipos de muestreo:

- de superficie directo,
- por hisopo,
- por enjuague, y
- por placebo.

#### **Muestreo de superficie directa**

Consiste en un instrumento de análisis directamente "aplicado a" la superficie limpia. El ejemplo más común de muestreo directo es la evaluación visual. En este caso, el ojo representa tanto análisis y muestreo. Los elementos clave que se consideran en muestreo visual son: la vista del espectador, la luz disponible para su visualización, la distancia del punto de vista de la superficie, el ángulo de la luz y el espectador hacia la superficie, la disponibilidad de la superficie, la naturaleza de los residuos y de la superficie

Al interpretar los resultados como visualmente limpia, es útil contar con una buena referencia de lo que significa visualmente limpia.

#### **Muestreo por hisopo**

Un hisopo es un objeto plástico con cabeza de fibra y un mango flexible que se utiliza para limpiar los residuos de una superficie. La cabeza del hisopo generalmente se humedece con disolventes (agua, un disolvente orgánico, o una

mezcla), y se limpia a una superficie muestra, con un patrón de movimiento definido. El residuo se extrae a posteriormente por desorción del tejido de la cabeza del hisopo en un disolvente adecuado para su análisis posterior.

Los elementos clave para la selección de hisopeo como una técnica de muestreo son:

- **La naturaleza de la fibra:** Para hisopos microbiológicos, la cabeza del hisopo son fibras de algodón unido a un mango. En algunos casos, la cabeza del hisopo es de fibras de alginato de calcio. Para este propósito los hisopos son esterilizados previo a su uso por razones obvias.

Los hisopos utilizados para los residuos químicos pueden variar considerablemente. Sin embargo, los más comunes están hechos de una cabeza con un tejido de poliéster, que se sujeta a un mango de plástico un proceso de fundido adecuado, de modo que se eviten los adhesivos que causen interferencias con los análisis. También es preferible usar hisopos de baja aportación del material para minimizar las interferencias y evitar que cubran la detección del residuo.

- **Los solventes utilizados para la humectación y desorción del hisopo:** El disolvente utilizado debe ser apropiado para ayudar en la eliminación de residuos de la superficie. Además, de ser adecuado con cualquier procedimiento analítico posterior.

Otras opciones incluyen utilizar únicamente agua o agua ajustada a un pH alto o bajo (El pH en función de la solubilidad de los activos).

Si el análisis de carbono orgánico total (TOC, por sus siglas en inglés) es el método analítico, los disolventes orgánicos no se deben utilizar porque interferiría con una medición precisa de carbono en el residuo.

La cantidad de disolvente utilizado para la desorción también puede ser crítico, pues se necesita una cantidad mínima de disolvente para el método analítico. La cantidad que se utiliza también afecta el límite de cuantificación necesario del método analítico.

- **El número de hisopos que se utilizarán:** Generalmente se utiliza uno o dos, y al utilizar más de uno se incrementa el recobro del residuo. Un solo hisopo no puede recuperar todo el residuo, y dejará un poco de solvente con remanente de residuo de interés, y por tanto se necesitará un segundo hisopo seco, o incluso considerar el mismo hisopo enjuagado (en una cantidad determinada de diluyente) y exprimido. El segundo hisopo seco mejora el recobro pues absorbe el solvente remanente con facilidad a comparación del hisopo húmedo. El segundo recobro con hisopo enjuagado es efectivo cuando se utilizan solventes muy volátiles. En caso de utilizar método TOC para determinar residuos, no se recomienda utilizar un segundo hisopo pues aumenta la aportación de carbono al blanco y por tanto no habría beneficio al desear recuperar el remanente de residuo.
- **El área de superficie a muestrear:** Comúnmente varía de 25 a 100 cm<sup>2</sup>. Para superficies planas o casi planas hay varias técnicas para controlar el área a muestrear.

Se puede utilizar una guía sobre el área a muestrear con un marco de 25 a 100 cm<sup>2</sup>, hecho de plástico, polímero químicamente inerte (politetrafluoroetileno – PTFE). Se debe calificar al personal que esté destinado a realizar el muestreo y conozca el área y tamaño a muestrear.

- **Localización del área a muestrear:** Las áreas seleccionadas son comúnmente aquellas áreas más difíciles de limpiar, representativas de diferentes materiales (por ejemplo: acero inoxidable, vidrio, y juntas entre áreas y materiales) y áreas representativas o de función diferente o alterna

(por ejemplo, paredes laterales, domos, válvulas, paletas de agitación o áreas de drenado). Si se muestrean estas áreas y los residuos en estas áreas son aceptables, entonces los residuos en otras áreas (fáciles de limpiar) serán también aceptables.

- **El patrón de muestreo:** Se refiere a la trayectoria que traza la cabeza del hisopo sobre el área a muestrear, ya sea que el patrón se repita a 90° y o se voltea la cabeza del hisopo (si es una cabeza plana, el uso de ambos lados mejora el recobro).
- **Manejo y transporte del hisopo:** El manejo apropiado depende del alcance establecido en el procedimiento analítico. Por ejemplo, si se utiliza análisis TOC, se necesita un cuidado extremo, usando guantes, evitando movimientos contaminantes, y cortar la cabeza del hisopo con limpieza y cuidado para llevar a cabo la extracción del residuo. También es importante considerar el tiempo que toma el transporte del hisopo en el solvente de extracción, desde el lugar de muestreo hasta el laboratorio para su análisis. El transporte prolongado del hisopo en solventes ácidos o básicos conllevan a extracción de especies de carbono a partir del material del hisopos, y en consecuencia una aportación de carbono a la determinación total. Otro factor a considerar es la temperatura, para evitar pérdida de volumen de solventes, e incluso la aceleración cinética de la degradación existente.
- **Los controles (Blanco, hisopos y placas):** Estos se utilizan en todos los casos. Para algunos métodos como el análisis de carbono orgánico total (TOC), estos controles son muy necesarios debido a la gran variación que aporta un hisopo blanco. Para otros métodos se deben utilizar controles para identificar cualquier fuente de error no proveniente de la muestra.

El control de muestreo (blanco) se debe preparar utilizando el mismo tipo y modelo de hisopo, solvente para desorción, y tipo de vial o material, así

mismo debe prepararse al mismo tiempo que la muestra experimental se toma. El hisopo blanco no toca la superficie a muestrear. El control no se debe preparar en el laboratorio, pues debe representar el manejo experimental de los hisopos. Se enfatiza la importancia de la preparación de otros controles en el laboratorio adicionales al hisopo control (blanco), por ejemplo, blanco hisopo+placa (cupón representativo del área a muestrear).

Todos estos factores deben describirse en el protocolo de validación y en el procedimiento estándar de operación (SOP).

### **Muestreo por enjuague**

Se utiliza un líquido para cubrir las superficies que se van a muestrear. Es importante examinar qué tan posible es determinar cualquier residuo que se retire fácilmente por enjuague. Esto se puede lograr demostrándolo con estudios de recuperación (o recobros).

Para realizarlo se tienen observaciones clave como asegurarse de que lo que se está midiendo en la muestra de enjuague está directamente relacionado al residuo de interés. Es decir que el método de enjuague demuestra la remoción del residuo de interés desde superficies modelo en estudios de recuperación.

### **Métodos de muestreo de enjuague:**

**Enjuague final de un solo punto:** Es una muestra que se tiene al final del proceso de enjuague. Si el medio de enjuague es agua entonces la muestra es acuosa, si se usa un disolvente para el enjuague final entonces la muestra es un disolvente. El volumen es de acuerdo a lo necesario en el método pero varía de 500 a 1000 ml. El punto de muestreo definido como aquel punto al final del circuito de limpieza en el cual el agua se drena. Este es el método más común de muestreo de enjuague, tiene la ventaja de ser un procedimiento sencillo, puede ser un método efectivo para sitios de muestreo que no son visibles o no están

disponibles al muestreo por hisopo, incluyendo tuberías de equipos. Este tipo de muestreo provee una medición total de la contaminación de un sistema, si se asume que la contaminación está dispersa uniformemente en toda la producción subsecuente de producto, entonces el muestreo por enjuague puede dar una medición válida de la contaminación potencial total del producto subsecuente.

Una cuestión clave es relacionar lo que se mide en la muestra de agua a posibles niveles de contaminación del residuo en el producto subsecuente. Si se hacen ciertas afirmaciones sobre lo que el enjuague final representa, entonces es posible afirmar que en el peor caso, un nivel de, por ejemplo X ppm en el enjuague final se correlaciona a no más de (eso es, un límite superior de) X ppm en el producto subsecuente. Si se toma esta aproximación, es útil aclarar esas afirmaciones en un documento de justificación.

**Muestreo por enjuague aislado:** Se lleva a cabo con una cantidad fija de medio después de que se completa el enjuague final del sistema. La única función es muestrear el equipo para propósitos analíticos (no para limpiar el equipo). El único criterio adicional en utilizarlo para la determinación de residuo, es que el procedimiento de enjuague (y por ende de muestra) toque todas las superficies del equipo.

Esto es necesario porque por enjuague no es posible enfocar la solución de enjuague a las superficies más difíciles de limpiar (a diferencia como se debe hacer con el muestreo con hisopo). Debido a esta limitación, todas las superficies se deben muestrear para obtener una idea de la contaminación total.

Este enjuague aislado tiene varias ventajas, una de ellas es que es posible utilizar una solución diferente a la del enjuague del equipo, la cual es solo agua. Si el agente activo tiene poca solubilidad en agua pero es más soluble en pH altos, por ejemplo, es posible utilizar una solución diluida de NaOH como el medio de enjuague para mejorar y asegurar el recobro de ese agente activo o residuo. Otra alternativa sería usar una mezcla de isopropanol/agua como solución de enjuague.

Una segunda ventaja es que dado que el enjuague se hace con una cantidad (volumen) fija de solución, es posible aproximarse más cuidadosamente a la concentración de la contaminación en el producto subsecuente.

En enjuagues diferenciados en los cuales la cantidad de solución de muestreo por enjuague es aproximadamente lo mismo a la cantidad del siguiente producto, un nivel de  $X$  ppm de residuo de interés en la muestra tomada por enjuague se correlaciona a aproximadamente  $X$  ppm del agente residuo en el producto subsecuente (pensado en una distribución uniforme).

Para procesos de enjuague continuo como un sistema *clean-in-place* (CIP, lavado en sitio), es probable que el volumen del muestreo de enjuague para muestrear todas las partes del equipo es considerablemente menos (hasta 80-90% menos) que el volumen del producto manufacturado subsecuentemente.

Si este es el caso, un nivel de  $1.0X$  ppm del agente de residuo en la muestra de enjuague se correlaciona a aproximadamente de  $0.1X$  a  $0.2X$  ppm del residuo en el siguiente producto. En este método de muestreo de CIP continuo, es posible influenciar el procedimiento analítico (tanto como se hace en el muestreo por hisopo) tal que relativamente cantidades altas de las muestras analizadas en realidad representan, significativamente bajos niveles de contaminación potencial en el producto subsecuente.

**Muestreo por placebo:** Este método involucra la manufactura de un lote de placebo (el medicamento sin el principio activo) del producto subsecuente a fabricar en el equipo limpiado. La siguiente manufactura del placebo se analiza buscando como residuo en cuestión, al principio activo del medicamento que fue fabricado antes de ser limpiado el equipo. Si se encuentra el principio activo en el placebo a cierto nivel, digamos  $X$  ppm, entonces se afirma que el nivel de contaminación del lote fabricado subsecuentemente con el activo sería el mismo. Si este nivel está por debajo del criterio de aceptación, entonces se asume que el equipo fue limpiado adecuadamente.

La posición de la FDA en sus documentos guía es que el muestreo por placebo es aceptable si se complementa ya sea con muestreo por enjuague o hisopo, pues al realizar un análisis por placebo se asume que el residuo contaminante está distribuido uniformemente en todo el lote del placebo y una muestra es representativa, además de que determinar el residuo en presencia de componentes del placebo representa un reto analítico. Por estas razones el muestreo por placebo no es considerado comúnmente. Sin embargo es útil en la evaluación de contaminación no uniforme en el producto manufacturado subsecuentemente.

### **Estudios de Recuperación**

Un método de muestreo tiene por objetivo remover cuantitativamente el residuo de la superficie para analizarlo posteriormente, esto se demuestra por medio de los estudios de recuperación, que son pruebas en las que una cantidad del residuo en cuestión es dispersado en una superficie modelo, después la superficie se muestrea con un procedimiento definido, y la muestra obtenida es analizada por el método analítico.

La cantidad de residuo en cuestión se expresa en porcentaje de la cantidad esparcida para conocer el porcentaje de recuperación, el cual se debe utilizar después para ajustar los resultados analíticos para representar exactamente la contaminación potencial.

Por ejemplo, si la contaminación de la superficie en un estudio de validación se tiene como resultado 12µg por hisopo, y la recuperación con ese método y ese residuo es de 75%, entonces la contaminación potencial es:

$$\frac{12 \mu g}{0.75} = 16 \mu g / \text{hisopo}$$

Los procedimientos de recuperación se determinan en el laboratorio, y algunos aspectos clave para lograr recuperaciones satisfactorias son:

- El modelo de superficie utilizado

- La cantidad del residuo contaminante
- La naturaleza del residuo
- El procedimiento de muestreo (por hisopo)

**El modelo de superficie utilizado:** Este debe reflejar las condiciones reales, por ejemplo, si el acero inoxidable es la superficie a muestrear por hisopo en el equipo entonces el residuo a probar se debe esparcir en placas de acero inoxidable. Tales placas deben ser de tamaño suficiente de modo que el área a probar sea la misma que la establecida en el Procedimiento de operación estándar (SOP, por sus siglas en inglés).

**La cantidad del residuo contaminante:** La cantidad de residuo, en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , debe estar en el rango de lo que se espera encontrar en los ensayos de validación reales. Este nivel debe estar definitivamente bajo el criterio de aceptación especificado para contaminación. Si se espera que la recuperación sea diferente dependiendo de los niveles de contaminación, entonces se debe realizar una serie de estudios de recuperación.

Por ejemplo, los estudios de recuperación se pueden hacer a niveles equivalentes al 10%, 30% y 60% del criterio de aceptación o se pueden hacer a 1x, 2x, 4x del límite de cuantificación (LOQ) del método analítico. También el porcentaje más bajo de recuperación obtenido puede ser usado con seguridad para ajustar los resultados analíticos reales, o una serie de porcentajes de recuperación se podrían utilizar dependiendo del resultado analítico obtenido.

**La naturaleza del residuo:** La naturaleza del residuo debe representar a aquella que se limpiará en el equipo, si el equipo se somete a vapor antes de ser limpiado entonces es apropiado que el residuo esparcido en la placa, se trate de manera similar de modo que el estudio de recuperación asimile lo más posible a las condiciones reales.

**El procedimiento de muestreo (por hisopo):** El Procedimiento de operación estándar (SOP) debe ser exactamente el mismo método utilizado en el protocolo de validación por hisopo. Esto incluye todos los aspectos revisados previamente relativos al muestreo.

Los estudios de recuperación por enjuague se pueden hacer en el laboratorio, de cualquier modo es difícil simular las condiciones de enjuague, particularmente de un sistema *clean-in-place* (CIP), en un estudio de laboratorio. La aproximación para estos estudios por enjuague es diseñar un estudio de laboratorio utilizando las condiciones del peor caso. Entonces se asume que el recobro bajo condiciones de muestreo de enjuague reales serían no menos que y más probables mayores que el porcentaje de recobro obtenido en el peor caso del estudio de laboratorio.

Los estudios de enjuague pueden ser simulados esparciendo el residuo de interés en el fondo de un contenedor de acero inoxidable y después aplicando el enjuague de manera que cubra la superficie con una agitación determinada (usualmente mínima) y un tiempo fijo (usualmente menos del tiempo de contacto esperado en el enjuague real en el equipo).

Una alternativa es esparcir una placa con el residuo y hacer el enjuague simulado permitiendo que una cantidad de medio de enjuague fluya sobre la placa hacia un contenedor para recolectarlo y analizarlo. Los aspectos discutidos en el muestreo por hisopo como la naturaleza de la superficie, y la cantidad y naturaleza del residuo, también aplican al método de muestreo por enjuague.

Un parámetro crítico adicional es el radio relativo de la solución de muestreo con el área muestreada, este se debe aproximar al encontrado en el proceso real. Como un peor caso, el radio de la cantidad de solución de muestreo con el área de superficie muestreada debe ser menor que la situación real.

Los recobros mayores al 80% son preferibles, los recobros con porcentajes mayores al 50% son aceptables, sin embargo, no son recomendables los recobros probados en niveles muy bajos pues pueden afectar considerablemente a los recobros con porcentajes de recuperación bajos.

Se debe enfatizar que ciertos métodos de muestreo se pueden considerar invasivos, de modo que se requiera una limpieza especial o repetir el proceso de limpieza antes de que el equipo pueda ser utilizado para continuar con la fabricación de productos.

## 2.2.6 Métodos de análisis y muestras

Existen múltiples opciones de determinación analítica para validación de limpieza.

### 2.2.6.1 Métodos específicos <sup>[5,14]</sup>

**HPLC:** Es una técnica de separación física en fase líquida en la cual la muestra se separa en sus componentes (o analitos) por medio de su distribución en una fase móvil (un flujo líquido) y a la fase estacionaria (adsorbentes empacados en el interior de la columna). Un detector monitorea la concentración de cada componente separado en el flujo y genera un cromatograma. Esta es una técnica ampliamente utilizada para el análisis cuantitativo de fármacos, biomoléculas, polímeros y otros compuestos orgánicos. En la industria farmacéutica se puede utilizar para la detección de pequeñas moléculas de ingredientes activos o residuos de detergentes para muestras de hisopo o enjuague, permitiendo la separación de múltiples componentes.

**Ventajas:** No está limitado a la extracción únicamente con agua, permite la separación de picos (separación de muestras multicomponentes), provee identificación de picos específicos, y resultados cuantitativos adecuados con el uso de un estándar de referencia, ofrece varias opciones de detección (UV, arreglo de fotodiodos, fluorescencia, índice de refracción, detectores evaporativos de luz dispersa, detector de aerosol cargado, etc.), permite utilizar una amplia

gama de hisopos debido a su poder de separación, además de que al combinar esta técnica con espectroscopía de masas (MS), se logra la selectividad del ingrediente activo al separarlo de sus compuestos de degradación con ayuda del radio de la relación masa-carga del compuesto de interés.

**Desventajas:** Requiere de más desarrollo y tiempo de validación en comparación con otras técnicas de detección, dependiendo de las características conocidas del ingrediente activo y los excipientes utilizados en la formulación, además de que la determinación por HPLC/MS es más cara.

La técnica HPLC es la opción más favorable y utilizada para lograr métodos analíticos satisfactorios en validación de limpieza. Esto es porque es una técnica versátil, adaptable, y disponible mundialmente además de proveer una reproducibilidad acorde a los programas de validación de cada empresa. Es una técnica bien conocida en la industria y por las agencias regulatorias. Así que la limpieza será tan buena tanto como la información generada por esta técnica.

### **Principios básicos de HPLC <sup>[14]</sup>**

Existen algunas consideraciones básicas para llevar a cabo un análisis por HPLC.

- 1.- La muestra debe ser soluble: Se necesita tener componentes solubles para asegurar la interacción con las fases estacionaria y móvil.
- 2.- Para lograr la separación, los analitos se deben retener y tener migración diferencial en la columna. La separación de los componentes no ocurre sin retención e interacción con la fase estacionaria. Los analitos deben tener retención diferencial en comparación con los otros componentes.
- 3.- La fase móvil controla la separación de HPLC: El desarrollo de métodos se centra en encontrar las condiciones que proveen una adecuada separación de los analitos, frente a otros componentes.

4.- La solución final de analito se debe preparar con fase móvil: La solución final se debe disolver en la fase móvil o en un solvente de menor fuerza polar que la de la fase móvil inicial. Si se utilizan solventes de mayor fuerza por razones de solubilidad, se debe considerar utilizar un menor volumen de inyección.

## Conceptos

Existen tres factores que controlan la separación (resolución) de los analitos:

- A) Retención
- B) Selectividad
- C) Eficiencia

### A) Retención.

Esta es la representación de un cromatograma común con un eje de tiempo, un punto de inyección y un pico del analito. El tiempo entre el punto de inyección y un pico del analito al llegar al detector se le llama tiempo de retención ( $t_r$ ). El tiempo de retención de un componente no retenido (comúnmente marcado por la primera alteración de la línea base causada por la elución del solvente de la muestra) se le llama tiempo muerto ( $t_0$ ). Este tiempo está relacionado al volumen muerto de la columna ( $V_0$ ). El pico tiene tanto ancho ( $W_b$ ,  $b$  significa que se mide sobre la línea base) y altura ( $h$ ). A veces el ancho medio del pico ( $W_{1/2}$ ) o el 5% de la altura del pico ( $W_{0.05}$ ) se utiliza para cumplir con las especificaciones farmacopéicas.

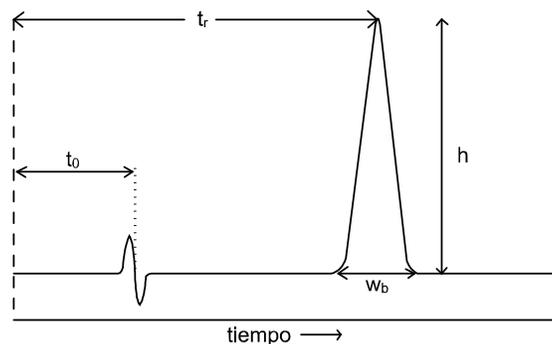


Fig. 2.1. Características de un pico cromatográfico.

La altura o el área de un pico es proporcional a la concentración o la cantidad del componente particular en la muestra. Cualquiera de estas dos características pueden ser utilizadas para realizar cálculos cuantitativos. Es más común utilizar el área del pico dado que provee una medición más exacta.

### **B) Factor de capacidad (k')**

Es un término fundamental que mide el grado de retención del analito, y es conocido como factor de capacidad o factor de retención (k'), es calculado a partir de la normalización del tiempo de retención neto ( $t_r'$ , tiempo de retención menos el tiempo muerto) por el tiempo muerto. El factor de capacidad mide cuántas veces el analito es retenido en relación a un componente no retenido.

$$\text{Factor de capacidad, } k' = \frac{t_r - t_0}{t_0},$$

Reescribiendo la ecuación tenemos:  $t_r = t_0(1+k') = t_0 + t_0k'$

Lo que indica que el tiempo de retención es proporcional a k'.

Un valor de  $k'=0$  significa que el componente no es retenido y eluye con el frente del solvente. Un valor de  $k'=1$  significa que el componente es ligeramente retenido por la columna mientras que un valor de  $k'=20$  significa que el componente es altamente retenido y pasa mucho tiempo interaccionando con la fase estacionaria. En la mayoría de los ensayos, los analitos eluyen con un valor de k' entre 1 y 20 de modo que tienen gran oportunidad de interaccionar con la fase estacionaria resultando en una migración diferencial. Los picos que eluyen con valores altos de k' (>20) son problemáticos a causa de corridas largas y sensibilidad escasa causadas por un excesivo ensanchamiento de picos en la columna.

### **Volumen muerto (V<sub>0</sub>)**

El concepto de volumen muerto (V<sub>0</sub>) es importante por varias razones. Es el volumen de la columna vacía menos el volumen ocupado por los sólidos del empaque. Es el soporte de volumen líquido de la columna del cual cada analito

debe eluir. Se observa que el volumen muerto es igual al tiempo muerto multiplicado por la velocidad de flujo (F).

$$V_0 = T_0 F$$

Comúnmente,  $V_0$  es equivalente al ~60-70% del volumen de la columna vacía con 30-40% del volumen ocupado por la fase estacionaria sólida y porosa.

$$\text{Volumen muerto } V_0 = 0.65 \pi r^2 L$$

Donde:

- $r$  es el radio interior de la columna
- $L$  es la longitud de la columna.

$V_0$  es proporcional al cuadrado del radio interior de la columna. Es importante tener una somera idea del volumen muerto de la columna pues ello a veces dicta el rango de operación de la velocidad de flujo, la capacidad para cargar la muestra, y la sensibilidad de masa (la cantidad mínima detectable) del ensayo. Por ejemplo, una columna analítica común (150mm x 4.6mm) tiene un  $V_0$  de alrededor de 1.5 ml y es operada a ~1.0ml/min. En contraste, si se reduce el diámetro interno a 2.0mm, una columna LC/MS común (150mm x 2.0mm) tiene un  $V_0$  de alrededor de 0.3ml y es operada a 0.2ml/min. El volumen muerto de la columna también controla los volúmenes de los picos que eluyen. Volúmenes muertos más pequeños conllevan a volúmenes de pico más pequeños, y por lo tanto, a concentraciones mayores del analito. Como resultado, si la misma masa del analito se inyecta, columnas de diámetros internos menores conllevan a una mayor sensibilidad. Sin embargo, los efectos de ensanchamientos extracolumna son más pronunciados en columnas de menor diámetro interno.

### **C) Selectividad ( $\alpha$ )**

La separación entre dos componentes solo es posible si tienen diferentes velocidades de elución a través de la columna. El factor de selectividad o separación es una medida de la retención diferencial de dos analitos. Se define como el ratio de los factores de capacidad ( $k'$ ) de dos picos. La selectividad debe ser  $>1.0$  para tener separación de picos. La selectividad es dependiente de la

naturaleza de la fase estacionaria (por ejemplo C18, C8, fenil-, ciano-, etc.) y la composición de la fase móvil. Los efectos de la selectividad en la fase móvil pueden ser usados por técnicos expertos para mejorar la separación de los analitos en la muestra.

#### D) Eficiencia de la columna (N)

La mayoría de los cromatogramas, tienen picos que tienden a ser de forma gaussiana, además de ensancharse con el tiempo, donde  $W_b$  se hace más grande con mayor  $t_r$ . Esto pasa por los efectos de ensanchamiento de banda dentro de la columna, y es fundamental para todos los procesos cromatográficos. El término, número de platos (N), es una medida cuantitativa de la eficiencia de la columna, se relaciona al radio del tiempo de retención y la desviación estándar del ancho de pico ( $\sigma$ ). Dado que  $W_b$  es igual a  $4\sigma$ , la siguiente ecuación ha sido derivada:

$$\text{Número de platos teóricos, } N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

La figura 2.2 muestra un cromatograma con un pico con un ancho de 10 unidades y un  $t_r$  de 135 unidades.

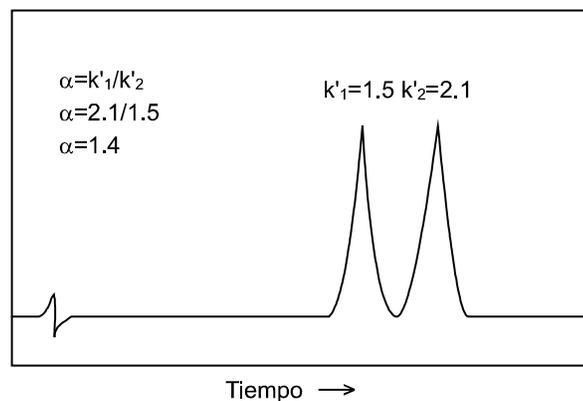


Fig. 2.2. Separación de dos picos cromatográficos.

La eficiencia de la columna (N) puede calcularse así:

$$N = 16 \left( \frac{135}{10} \right)^2 = 2916$$

Dado que es difícil medir  $\sigma$  o  $W_b$  manualmente, usualmente N se calcula utilizando una relación un ancho a la mitad de la altura o  $W_{1/2}$  como se describe en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP)

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$$

### E) Resolución

El objetivo de la mayoría de análisis por HPLC es la separación de uno o más analitos a partir de otros componentes en la muestra, para obtener información cuantitativa para cada analito. La resolución ( $R_s$ ) es el grado de separación de los picos de dos analitos juntos, y se define como la diferencia en tiempos de retención de dos picos dividido por el promedio del ancho de pico. Mientras los anchos de picos adyacentes tienden a ser similares, el promedio de ancho de pico puede ser igual al ancho de uno de los dos picos.

$$R_s = \frac{t_{r1} - t_{r2}}{\left( \frac{W_{b1} + W_{b2}}{2} \right)} = \frac{\Delta t_r}{W_b}$$

Un valor de resolución  $R_s=0$ , significa coelución completa o no separación, a un valor de  $R_s=0.6$  se puede distinguir un "hombro". A un valor de  $R_s=1$ , se logra una separación parcial, y aun  $R_s=1.5$  se logra una separación de la línea base. El objetivo principal de los análisis por HPLC es lograr la separación de la línea base para todos los analitos de interés. Es muy común lograr un  $R_s > 2.0$ , dado que tal condición asegura una separación y cuantificación robusta.

## F) Factor de coleo ( $T_f$ )

Bajo condiciones ideales, los picos cromatográficos tendrían comportamiento gaussiano con una simetría perfecta. En realidad, la mayoría de los picos están ligeramente frenteados o coleados. Como se muestra en la figura, el factor de coleo ( $T_f$ ) tal como es definida por la USP, es una medida de la asimetría. En este cálculo, se utiliza el ancho de pico al 5% de su altura.

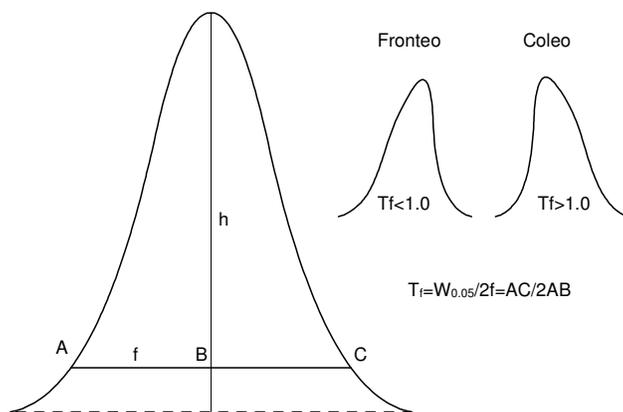


Fig. 2.3. El coleo mide la simetría del pico.

$$\text{Factor de coleo } (T_f) = W_{0.05} / 2f = AC / 2AB$$

La mayoría de los picos deben tener factores entre 0.9 y 1.4. Un valor de 1.0 indica una simetría perfecta del pico. El coleo del pico es comúnmente causada por la adsorción de otras fuertes interacciones del analito con la fase estacionaria mientras el frenteo puede ser causado por una sobrecarga de la columna, una reacción química o isomerización durante el proceso cromatográfico. Por ejemplo, muchos analitos básicos (aminas) muestran un coleo del pico debido a la fuerte interacción con los grupos residuales de silanol ácido en fases hechas con base de sílica.

## G) La ecuación de resolución

La efectividad de la separación ( $R_s$ ) en el análisis HPLC es dependiente de dos factores termodinámicos (retención y selectividad) y factores cinéticos (ancho de pico y eficiencia de columna). La relación con otros parámetros se puede expresar un tanto cuantitativamente en la ecuación de resolución:

$$R_s = \left( \frac{k'}{k'+1} \right) \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \left( \frac{\sqrt{N}}{4} \right)$$

incluye retención, selectividad y eficiencia, respectivamente.

Una revisión de esta ecuación indica que  $R_s$  se controla por tres términos independientes: retención, selectividad y eficiencia. Para maximizar  $R_s$ ,  $k'$  debe ser relativamente grande. De cualquier modo, un valor de  $k' > 10$  se acercará a un punto de rendimientos decrecientes en tanto el término de retención ( $k'/k'+1$ ) tiende a la unidad. La separación no es posible si  $k'=0$ , dado que  $R_s$  será igual a cero si  $k'$  es cero en la ecuación de resolución.

La selectividad ( $\alpha$ ), el ratio de  $k'$  para dos picos que eluyen juntos, es cercano a 1.0, comúnmente entre 1.01 y 1.50. La selectividad se maximiza utilizando una columna o condiciones de fase móvil que resuelva todos los analitos críticos.

Un pequeño aumento de selectividad puede tener un efecto mayor en la resolución, en tanto que la resolución es proporcional a  $(\alpha-1)$ . Las columnas con diferentes empaques (C8, Fenil, CN, etc.) también pueden resultar en un efecto de selectividad diferente, debido también por el diferente orden de elución de analitos. Finalmente, la cantidad de platos ( $N$ ) debe ser maximizada utilizando una columna más larga o utilizando columnas empacadas con partículas más pequeñas. De cualquier modo, incrementar  $N$  no es una forma eficiente de lograr la resolución dado que  $R_s$  es proporcional a la raíz cuadrado de  $N$ . Por ejemplo, incrementar la longitud de la columna por 2 incrementará el tiempo de análisis al doble, pero solo incrementará la resolución  $\sqrt{2}$  ó cerca del 41%.

En resumen, durante el desarrollo del método, la estrategia general es encontrar un disolvente cuya fuerza eluya todos los solutos a un  $k'$  entre 1 y 20, y separe todos los analitos críticos por variación del solvente orgánico y otros modificadores de la fase orgánica. Si esto no se logra satisfactoriamente, se debe intentar con una columna con empaque diferente. Para una separación simple, es más productivo variar la selectividad cambiando la fase móvil que una columna de

empaques diferentes. Los esfuerzos para incrementar N cambiando a una columna más larga son caros, en términos del tiempo de análisis. Una alta eficiencia de columna, como sea, es necesaria para mezclas complejas tales como formulaciones basadas en productos naturales o pruebas de impurezas de medicamentos con varios ingredientes. Frecuentemente se necesita del análisis con gradiente para tales mezclas complejas.

### **Infrarrojo (IR)**

Esta técnica es utilizable también para detección de algunos activos o productos de degradación característicos.

**Ventajas:** Es una técnica relativamente rápida, fácil y sensible, se evita utilizar alcoholes y agua como diluentes (interferencia de grupos  $-OH$ ), útil en determinación de ingredientes poco solubles en agua y permite utilizar solventes orgánicos, lectura, identificación y caracterización rápida, el análisis es relativamente barato.

**Desventajas:** Pocas opciones al elegir un solvente, además de que algunos son tóxicos y requerirán de limpieza adicional del equipo después del muestreo.

### **Otras técnicas**

#### **Cromatografía de gases (GC) y espectroscopía de masas (MS)**

Se utilizan principalmente para la detección de residuos de detergente. Estos agentes de limpieza contienen comúnmente varios solventes o compuestos necesarios para limpiar efectivamente los equipos que no son limpiables con detergentes comunes. La mayoría de los solventes de los agentes de limpieza son volátiles y se evaporan de la superficie del equipo, y algunos residuos permanecerán a partir de compuestos menos volátiles.

**Ventajas:** ofrecen la mejora de la forma de los picos debido a la capilaridad de las columnas y proveen de separación, identificación, y cuantificación de resultados cuando se utiliza un estándar de referencia aceptable.

**Desventaja:** Las muestras requieren de vaporización.

### **Espectroscopía UV-visible**

Esta técnica se utiliza comúnmente para la detección de moléculas pequeñas de ingredientes activos (API's) o residuos de detergentes en muestreo por hisopo o enjuague.

**Ventajas:** No exige el uso de agua como diluyente para extracción, provee resultados cuantitativos, no requiere de fases móviles o columnas, ofrece rápida adquisición de espectros y permite utilizar una amplia gama de hisopos en comparación con la técnica TOC.

**Desventajas:** Carece de separación de picos, y requiere de cromóforos para lograr especificidad.

### **Espectroscopía de movilidad de iones (EMI, en inglés IMS)**

Caracteriza las sustancias químicas basado en la movilidad de sus iones en fase gaseosa, provee detección y cuantificación de analitos traza, y ofrece ionización química a presión atmosférica (APCI), una técnica de ionización fina que genera información relativa al peso molecular.

**Ventajas:** Ofrece análisis cuantitativo ultrarrápido (~30 segundos por muestra), tiene sensibilidad a nivel de subnanogramos, es capaz de analizar una amplia gama de compuestos sin necesidad de cromóforos, no requiere de fases móviles, columnas o vacío para su operación, y diseñado para diferentes formas de introducción de la muestra, ya sea por desorción de una membrana (residuo sólido en hisopo resultando un análisis cuantitativo o una solución depositada en la membrana, lo cual permite el análisis cuantitativo) o por inyección de alto

desempeño, que permite una inyección para cromatografía similar a la de gases con split/splitless de temperatura programable.

**Desventajas:** Los compuestos deben ser vaporizables y ionizables, las muestras deben estar relativamente limpias, se deben utilizar diluentes ultrapuros además, no es una técnica adecuada para analizar muestras multicomponentes.

#### 2.2.6.2 Métodos no específicos

##### Carbono orgánico total (TOC)

Una forma de realizar la detección visual es planear estudios de dispersión, en los que las placas con el mismo tipo de superficie que se utilizarán para el procedimiento de limpieza se inoculen con cantidades conocidas del residuo. El análisis TOC es específico a compuestos orgánicos y teóricamente mide todo el carbono unido covalentemente en agua (por tanto no específico entre compuestos orgánicos).

**Ventaja:** Es que es una forma aceptable para detectar residuos de contaminantes (ingredientes activos, excipientes, detergentes, etc.).

**Desventajas:** Se debe considerar un peor caso dado que esta técnica incorpora todas las moléculas orgánicas en solución y representa un área de superficie dependiendo del método de muestreo, ya sea por hisopo o enjuague; además se debe confirmar que el contaminante es orgánico y contiene carbono que puede ser oxidable bajo las condiciones de la técnica, los analitos deben ser solubles en agua, y el agua debe ser ultrapura, adicionalmente la selección del hisopo es crítica, dado que algunos tipos de hisopos pueden interferir (aportación de carbono) en la determinación.

### 3. FÁRMACO

Fármaco en estudio: Nistatina <sup>[21,22,23]</sup>

La nistatina es una sustancia, o mezcla de dos o más sustancias, producida por el crecimiento de *Streptomyces noursei*, considerada un antibiótico antifúngico

#### 3.1 Molécula

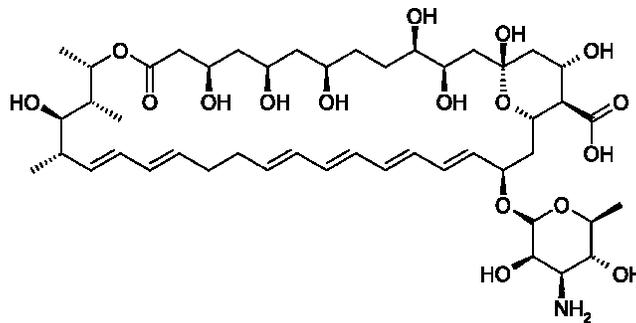


Fig. 3.1. Nistatina

Fórmula condensada:  $C_{47}H_{75}NO_{17}$ , Peso molecular: 926.09 g/mol. Posee una cadena cíclica de 37 átomos de carbono y un oxígeno, con tres sustituyentes metilo, un aminoazúcar (la micosamina,) y seis dobles enlaces que hacen a la molécula vulnerable a la luz, el oxígeno y las alteraciones del pH. También posee el nombre de fungicidina.

#### 3.2 Indicaciones terapéuticas

Está indicada en el tratamiento de la candidiasis en las mucosas oral, vulvovaginal e intestinal, así como en el tratamiento de las infecciones micóticas cutánea y mucocutánea. No se indica para uso sistémico. La nistatina es fungistática y fungicida *in vitro* contra una variedad de levaduras y hongos parecidos a levaduras.

#### 3.3 Contraindicaciones

Se contraindica en pacientes con historial de hipersensibilidad la sustancia.

### **3.4 Farmacocinética y farmacodinamia**

La absorción gastrointestinal de la nistatina es insignificante. La mayoría de la nistatina administrada por vía oral pasa sin cambios en las heces. No se absorbe a través de la piel o membranas mucosas intactas. Actúa al unirse con esteroides en la membrana celular de los hongos, en donde ocasiona cambios en la permeabilidad de la misma, que ocasionan la salida de componentes intracelulares. No tiene actividad apreciable en contra de bacterias, protozoarios o virus. En estudios revela que el incremento en los niveles de nistatina no produce resistencia en *Candida albicans* y generalmente no se produce el desarrollo de resistencia a nistatina durante el tratamiento.

### **3.5 Propiedades fisicoquímicas**

Polvo de apariencia amarillento a café claro, higroscópico, de aroma poco perceptible. Solubilidad 4g/l agua a 28°C, 11.2g/l metanol, 1.2 g/l alcohol etílico, 0.390g/l acetona, 0.48 g/l cloroformo, 0.29 g/l tolueno.

### **3.6 Estabilidad y reactividad**

La molécula se deteriora a la exposición de calor, luz, humedad y aire. Es estable por 10 minutos en una suspensión acuosa calentada a 100°C a pH 7.0, también es estable en medio moderadamente alcalino, pero lábil a pH 9 y pH 2. Una evidencia de su inestabilidad es el cambio de color de la preparación que la contiene, pasando de un color crema o amarillo claro a un color café o café oscuro. Una solución degradada muestra un pico aumentado de la impureza en un cromatograma de HPLC.

### **3.7 Información toxicológica**

Es un irritante al tracto respiratorio. Es altamente tóxico al administrar por vía intravenosa. Toxicidad aguda oral, LD50 (Rata): 10,000 mg/kg, LD50 (Ratón):8,000 mg/kg. La información experimental indica que tiene un potencial bajo para causar una intoxicación aguda por ingestión. Es generalmente bien

tolerada en todas las edades, inclusive por infantes debilitados o en tratamientos prolongados. No es tóxica ni sensibilizante. Rara vez puede ocurrir irritación y sensibilización. Con dosis muy elevadas se ha informado ocasionalmente diarrea, náusea, vómito y dispepsia. En raras ocasiones se ha observado enrojecimiento y urticaria. Muy raras veces se ha reportado síndrome de Stevens-Johnson.

### 3.8 Identificación y cuantificación

Absorción máxima por UV: El espectro de absorción UV en el intervalo de 220 a 350 nm, una solución muestra máximos a 230 nm, 291 nm, 305 nm y 319 nm. La relación entre los valores de absorbancia a 291 nm y 319 nm, con relación al máximo de absorbancia a 305 nm es de entre 0,61 y 0,73 y entre 0,83 y 0,96, respectivamente. La relación entre los valores de absorbancia medida a 230 nm y 280 nm es de entre 0,83 y 1,25.

Determinación por HPLC: Para esta determinación, la inyección de un determinado volumen de una solución estándar de referencia de nistatina, muestra dos picos en el cromatograma. El pico principal es la nistatina, y el segundo pico representa la impureza o sustancia de degradación (alrededor del 7% de la suma de ambos picos) Con Rf's de 1.0 y 1.35 respectivamente.

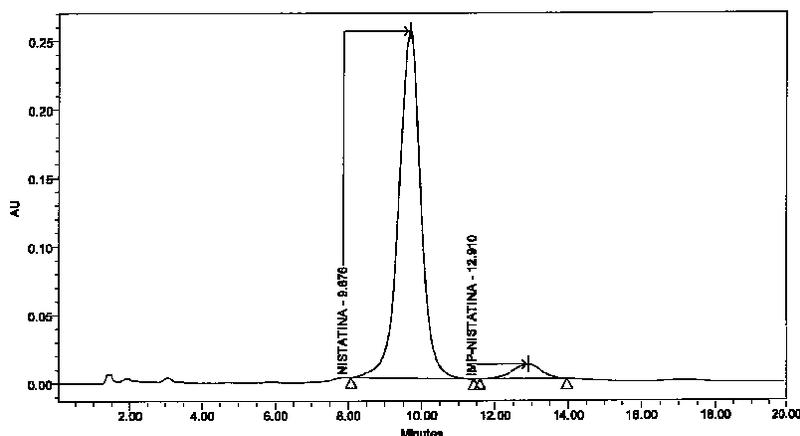


Fig. 3.2. Cromatograma de una solución de la sustancia de referencia

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 4.1 Planteamiento

Se realiza la validación de proceso fabricación de productos específicos que son parte de una familia de productos formulados con el mismo principio activo (nistatina). El objetivo es la exportación de estos productos a Brasil y su entidad regulatoria en sus normas requiere demostrar la limpieza de las superficies del equipo de fabricación, además de superficies de la instalación como pared, piso y techo.

En la Resolución 210 del 4 de agosto de 2003, la entidad regulatoria ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil) pide a todos los fabricantes de medicamentos cumplir con los lineamientos establecidos en el Reglamento Técnico de Buenas Prácticas de Manufactura para la Fabricación de Medicamentos\*. En este documento existen puntos específicos que se enuncian a continuación:

- *Validación*

*Los estudios de validación son una parte esencial de las BPM y por lo tanto debe llevarse a cabo de acuerdo con protocolos predefinidos. Se debe tener el informe escrito que resuma los resultados y conclusiones. Los procesos y procedimientos deben establecerse de acuerdo con los resultados del estudio de validación y deben someterse a la revalidación periódica para asegurar que la garantía de que siguen siendo capaces de alcanzar los resultados planificados. Se debe prestar especial atención a los procedimientos de validación, pruebas y control de los procedimientos de limpieza.*

- *Instalaciones*

*Las instalaciones deberán estar ubicadas, diseñadas, construidas, adaptadas y mantenidos de manera que sean adecuadas para las operaciones a realizar. Su diseño debe minimizar el riesgo de errores y permitir la limpieza y mantenimiento, para evitar la contaminación cruzada,*

*la acumulación de polvo y la suciedad o cualquier efecto adverso que pueda afectar a la calidad del producto.*

*Los locales deberán poseer ambientes que se consideren simultáneamente con las medidas para proteger las operaciones de fabricación, para tener un riesgo mínimo de contaminación de materiales o de los productos que maneja.*

*Las instalaciones utilizadas en la fabricación de medicamentos deben ser diseñadas y construidas para permitir una limpieza adecuada.*

*Los locales deberán mantenerse en buen estado de limpieza e higiene. Es preciso garantizar que el mantenimiento y la reparación no represente ningún riesgo para la calidad del producto.*

*En las áreas donde las materias primas, materiales de acondicionamiento primario, productos intermedios o granel estén expuestos al medio ambiente, las superficies interiores (paredes, suelo y techo) irán revestidas con un material liso e impermeable lavable y duradero, libre de las articulaciones y grietas además ser fácil de limpiar, permitiendo la desinfección y no debe liberar partículas.*

Esta acción implica realizar una validación de limpieza del equipo que se utiliza para la fabricación de estos productos. Además en dicha validación se considerarán las superficies exteriores. En las instalaciones de la planta de fabricación en México, el techo y la pared cuentan con el mismo acabado, y algunas de las paredes cuentan con ventanas. El piso cuenta con un acabado epóxico. Para el caso de estas instalaciones se considera demostrar la limpieza en tres superficies diferentes: pared, piso y ventanas. Se busca conocer la recuperación más efectiva de acuerdo a la naturaleza del principio activo: Nistatina en las superficies de interés.

## 4.2 Objetivos y plan del desarrollo

Transferencia de un método analítico de limpieza que determina trazas de nistatina en equipo de fabricación, este método está enfocado a determinar trazas en acero inoxidable. Los objetivos son:

- 1) Transferir el método analítico de la casa matriz y validar su adecuabilidad al laboratorio químico de la planta en México.
- 2) Extrapolar la determinación de trazas de nistatina en las superficies de paredes, pisos y ventanas.

Para llevar a cabo el desarrollo y validación de este método se recurre a la consulta de las directivas internas, guías oficiales y regulaciones nacionales e internacionales, se revisa el historial de validación de los productos de la misma línea. Se apoya en la existencia de validaciones que proporcionan información de método que ayudan a hacer más objetiva la validación en algunos de los parámetros de operación. Para lograr estos objetivos se realizan estudios de recuperación preliminares (muestreo por hisopo y enjuague) para probar la utilidad de diferentes diluentes e hisopos en superficies representativas de la instalación a validar.

Al determinar los elementos que son útiles se emite un protocolo de validación para llevarlo a cabo después de su aprobación; los resultados de la validación se anexarán al reporte de validación, a partir del cual se escribe el método analítico de muestras de validación para detección de trazas de nistatina, por hisopo y enjuague. El reporte y el método se revisan y se aprueban para después establecerlos como método validado.

### 4.3 Pruebas preliminares

#### Hisopo

Se prueba la recuperación de nistatina en placas modelo de acero pared piso y ventana con dos hisopos diferentes (Hisopo A, hisopo B). Se prueba a tres porcentajes del nivel aceptable de residuo (Acceptable Residue Limits, ARL, por sus siglas en inglés) de nistatina (50, 100 y 150%) por triplicado.



Texwipe TX761 Alpha® Swab with Long Handle

**Hisopo A** Descripción: Es un hisopo con un mango largo y flexible recomendado para el muestreo de áreas difíciles de alcanzar. La cabeza es de tejido de poliéster, y posee una doble capa para dar más cuerpo y absorción.

Fuente: <http://www.texwipe.com/store/p-837-alpha-swab-with-long-handle.aspx>



Texwipe TX714A Large Alpha® Swab

**Hisopo B** Descripción: Es un hisopo de poliéster para limpieza de superficies amplias y áreas planas. La cabeza lavada de tejido de poliéster es extremadamente limpia. Posee un mango rígido y largo y una cabeza plana interna que provee soporte. Sus niveles de limpieza proveen un *background* neutro para la muestra obtenida.

Fuente: <http://www.texwipe.com/store/p-815-large-alpha-swab.aspx>

Fig. 4.1. Hisopos retados para elección de un muestreo adecuado.

### 4.4 Validación del método cromatográfico

#### Equipos e instrumentación, reactivos y materiales.

Estándar certificado USP de Nistatina (5751 U/mg), acetonitrilo (grado HPLC, Tedia), ácido acético glacial (J.T. Baker), acetato de sodio anhidro (J. T. Baker), metanol (grado HPLC, Sigma), agua ultrapura obtenida en equipo NanoPure (Barnstead), hisopos TX7114A y TX761 (TexWipe).

Equipo y columna: El sistema HPLC utilizado Waters 2696, Detector PDA (UV), y software Empower. Se utiliza una columna Zorbax ODS 25 cm x 4.6 mm x 5µm (Agilent). Las condiciones cromatográficas para esta columna son: fase móvil de solución amortiguadora: metanol: acetonitrilo, flujo de 1.5 ml/min a temperatura ambiente, se inyecta una cantidad determinada de muestra en una corrida de tiempo establecido y se detecta la nistatina a una longitud de onda de 304 nm.

#### **4.5 Desarrollo**

##### **Preparación de solución estándar**

Se prepara una solución de estándar de nistatina USP (presecado a 40°C por 2 h a una presión menor de 5 mmHg). Se pesa la cantidad necesaria para conseguir una concentración de 1600 U/ml (100% ARL).

##### **Preparación de Blancos**

Blanco: En la determinación por HPLC el blanco es el diluyente.

Blanco Diluyente + hisopo: Se coloca un hisopo en un tubo de ensayo y se adiciona 5ml de diluyente (volumen utilizado para el muestreo). El tubo se agita mecánicamente durante 10 minutos.

Blanco Diluyente + hisopo + placa: Se dispersan 300µl de diluyente en cada de las superficie modelo de acero, pared, piso y ventana abarcando un área de 65 cm<sup>2</sup>. Las superficies se secan con aire seco o a temperatura ambiente. Posteriormente se hace el recobro como se indica en Recobros.

##### **Preparación de superficies modelo (Acero, pared, piso y ventana)**

Se prepara una solución de carga de nistatina para esparcir en placas modelo de 65 cm<sup>2</sup>. Esta solución está en concentración de acuerdo a la cantidad equivalente al 100% del nivel aceptable de residuo (ARL) en la superficie modelo.

Cada una de las superficies modelo se esparcen con 300µl de la solución de carga abarcando un área de 65 cm<sup>2</sup>. La superficie se seca con aire seco o a temperatura ambiente.

Nivel del ARL	Placa 1	Placa 2	Placa 3
50%	150µl	150µl	150µl
100%	300µl	300µl	300µl
150%	450µl	450µl	450µl

Tabla 4.1. Esquema de pruebas

### Recobros y preparación de muestras

Se adicionan 5ml de diluyente en un tubo de ensayo, se humedece el hisopo y se elimina el exceso de diluyente presionando contra las paredes del tubo. Se recupera la nistatina de la superficie con movimientos verticales, horizontales y diagonales usando cada lado, de modo que se utilicen los 4 costados del hisopo (Ver fig. 4.2). El hisopo se coloca en el tubo con diluyente y se agita suave y circularmente durante 30 segundos. El hisopo se levanta del diluyente y se exprime contra la pared del tubo. Este procedimiento se repite dos veces más (Tres pases en total). Posteriormente se agitan mecánicamente durante 10 minutos. Todos los hisopos a utilizar deben ser prelavados y secados antes de su uso. Las muestras de recobros se vierten a viales para su análisis por HPLC.

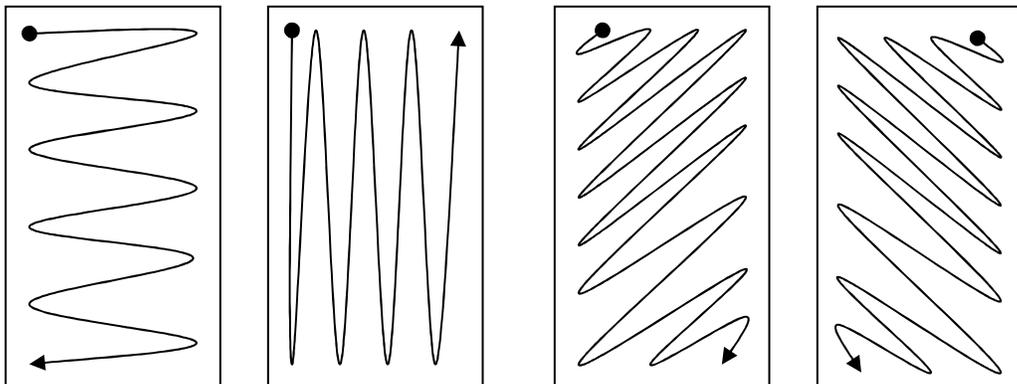


Fig. 4.2. Muestreo de superficie con movimientos verticales, horizontales con cada lado del hisopo, incluyendo ambos cantos en movimientos diagonales, de tal manera que uno de los 4 lados del hisopo sean utilizados en cada movimiento. Este conjunto de movimientos representa un pase.

#### **4.6 Parámetros de evaluación.**

De acuerdo a los requerimientos recomendados por la guía ICH-Q2A “Text on validation of analytical procedures” y la USP, para la detección de impurezas, los parámetros a evaluar son: Exactitud, precisión, especificidad, linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ) y rango.

## 5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 5.1 Pruebas preliminares

Los recobros de principio activo fueron ejecutados en cuatro diferentes placas representativas de Equipo (acero), Pared, piso y ventana con una inoculación correspondiente al 100% del nivel aceptable de residuo (ARL) y un muestreo único horizontal-vertical. Se realizó la determinación por HPLC y la concentración total del recobro se determinó con la suma del activo y la impureza del mismo. Se probó la recuperación con un hisopo (A) cuya extensión es menor al segundo hisopo (B), y además con el hisopo B prelavado.

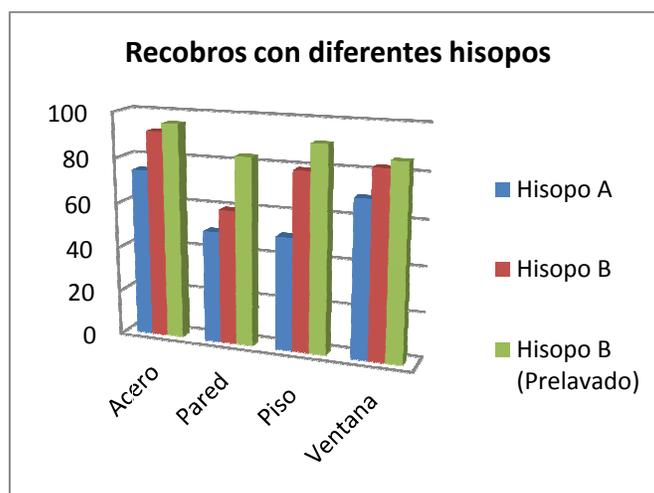


Fig. 5.1. Comparación del porcentaje de recobro de diferentes hisopos.

Los recobros en acero inoxidable son muy efectivos en comparación con las placas de pared, piso y ventana. Comparando los recobros con diferentes hisopos en el mismo tipo de placa, es fácil distinguir la diferencia entre hisopo A e hisopo B. En todas las superficies, el hisopo A tiene un recobro menor que B, dado que último posee un tamaño más extenso. Sin embargo al realizar el prelavado de los hisopos B se obtiene una recuperación aún mayor (Ver figura 5.1).

Posteriormente, para mejorar aún más la recuperación, se probaron diferentes métodos de muestreo. Los diferentes métodos variaron en el tipo de hisopo, la

trayectoria y posición del mismo, así como el número de pases para un solo recobro.

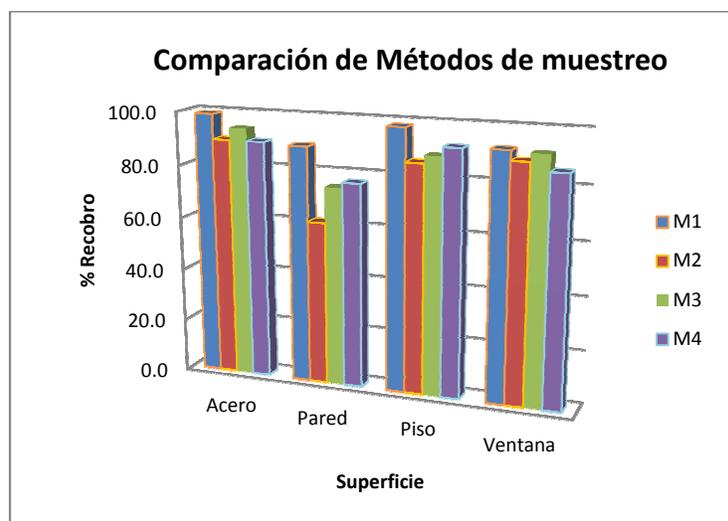


Fig. 5.2. Comparación de diferentes métodos de muestreo en las cuatro superficies probadas.

Para cada superficie, se probaron 4 métodos de muestreo, a los cuales se les determinó el porcentaje de recuperación con la concentración determinada de principio activo más la impureza. Los resultados indican que la recuperación en cada superficie, el método más efectivo es el número uno (Ver figura 5.2).

## 5.2 Parámetros de operación del método cromatográfico

Se revisa el cumplimiento de los parámetros de evaluación.

**Exactitud:** Se evaluó la continuidad del dato de referencia (de pureza conocida) y el valor obtenido de la muestra. Se evaluó en la determinación de la impureza en los recobros con hisopo. Se utilizaron 3 niveles por triplicado, con un rango desde el LOQ hasta el equivalente de 20 veces el LOQ. El criterio de aceptación es de  $\pm 50\%$  (50 a 150%) en promedio para cada nivel.

Nivel	Promedio	Gráfica de linealidad
<b>Acero</b>		
50%	102	<p><b>Superficie de Acero</b> <math>y = 1,0993x - 0,0698</math> <math>R^2 = 0,9967</math></p>
100%	104	
150%	107	
<b>Pared</b>		
50%	98	<p><b>Superficie de Pared</b> <math>y = 0,9318x + 0,0535</math> <math>R^2 = 0,9799</math></p>
100%	100	
150%	95	
<b>Piso</b>		
50%	98	<p><b>Superficie de Piso</b> <math>y = 1,0603x - 0,0706</math> <math>R^2 = 0,9984</math></p>
100%	99	
150%	103	
<b>Ventana</b>		
50%	103	<p><b>Superficie de Ventana</b> <math>y = 1,0496x + 0,0229</math> <math>R^2 = 0,989</math></p>
100%	112	
150%	104	

Tabla 5.1. Resumen de resultados de recobros y linealidad de la determinación de trazas en las diferentes superficies.

**Precisión:** Se calculó la habilidad del método para generar resultados reproducibles. Se evaluó usando tres diferentes determinaciones para repetibilidad. La repetibilidad se llevó a cabo por un solo analista y varía solo en el número de preparaciones de muestras. Se midió preparando 3 muestras a niveles de concentración de 50%, 100% y 150% del ARL. Así se evalúa la eficiencia de las condiciones del método y estima la variabilidad esperada de un solo analista y el sistema de HPLC para tales muestras.

**Especificidad:** Se evaluó la habilidad para discriminar entre analitos de interés y otros componentes que estén presentes en la muestra. Se establecieron pruebas para evaluar el grado de interferencia de otros analitos (impurezas, productos de degradación, excipientes, etc.) que puedan provenir del solvente, material del hisopo, de la placa modelo (o del equipo). La respuesta del método fue debida únicamente al activo y su impureza, y en la cromatografía no se encontró otro pico que interfiriera con los picos de interés. Figuras 5.3 y 5.4.

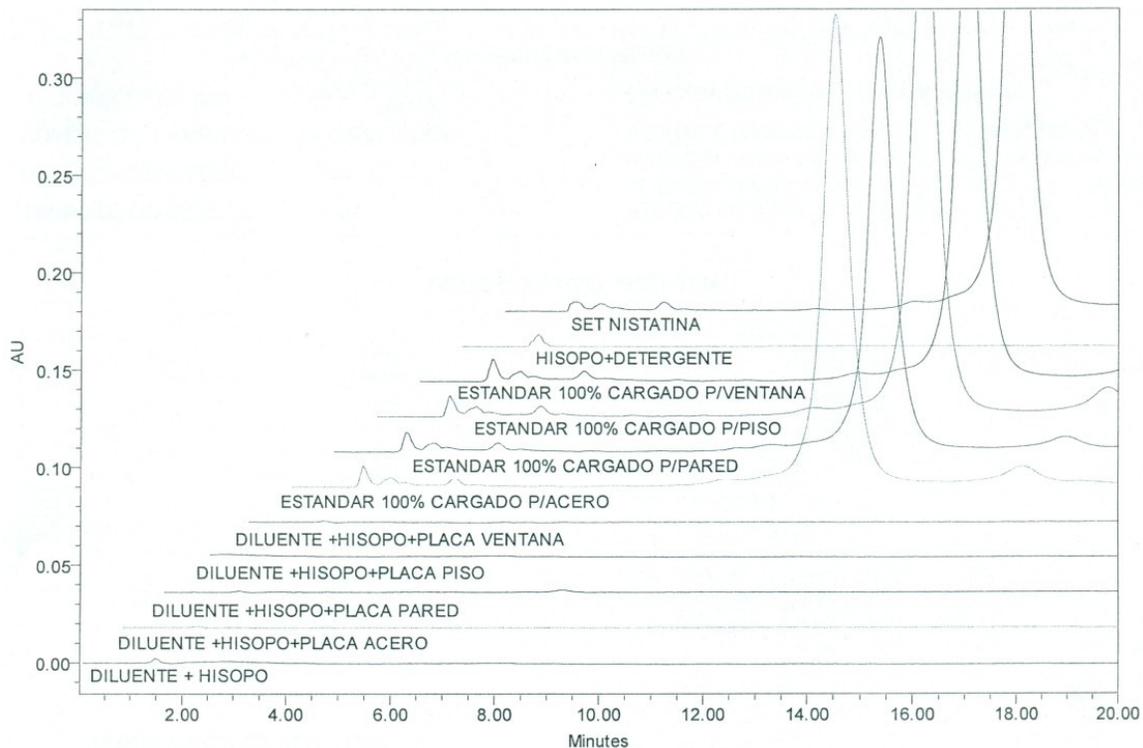


Fig. 5.3. Especificidad de la determinación en blancos y superficies.

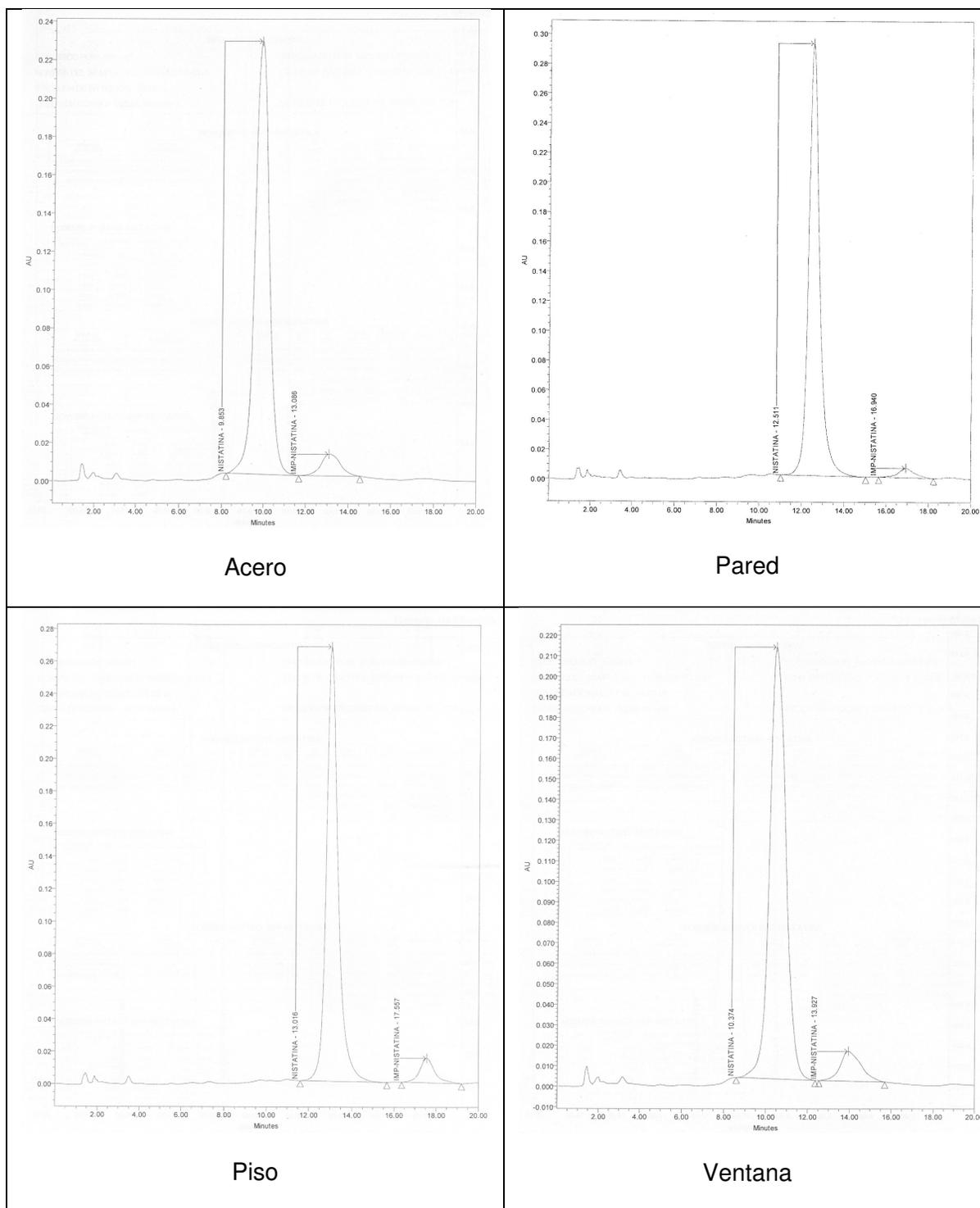


Fig. 5.4. Cromatogramas representativos de la especificidad en los recobros en cada superficie.

**Linealidad:** Se evaluó la habilidad del método para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de la muestra en un rango dado. Para este método se evalúa la relación entre la concentración de la muestra y la respuesta del detector (área o altura del pico, en cromatograma del HPLC).

Se preparan un rango con un mínimo de cinco concentraciones (50 a 120% de acuerdo a USP), y se realiza la gráfica de la respuesta del detector contra la concentración de la muestra (Fig. 5.5). Se evalúa por medio del cálculo del coeficiente de correlación R, es no menor de 0.98.

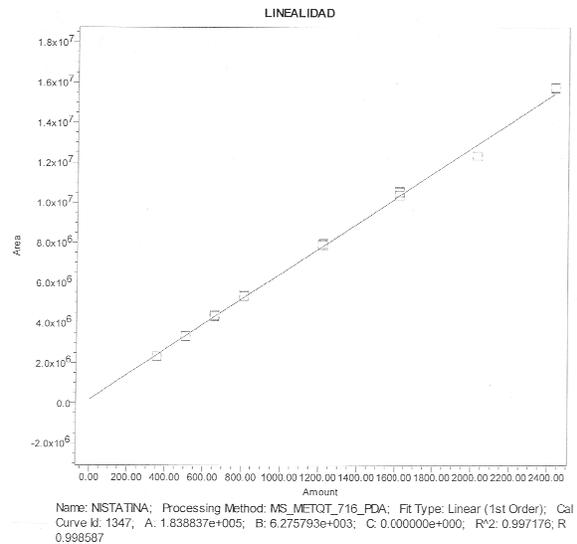


Fig. 5.5. Gráfico de la linealidad del método.

Límite de detección (LOD): Es la mínima concentración de analito que se puede detectar y no necesariamente cuantificar. Para este método se calculó por medio de la desviación estándar de la respuesta obtenida en la linealidad, con el uso de la fórmula:

$$\text{LOD} = \frac{3.3 \sigma}{P}$$

Donde:

- $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta
- P es la pendiente

Límite de cuantificación (LOQ): Es el nivel mínimo al que un analito puede ser cuantificado con un grado de precisión y exactitud. Se determinó de un modo similar al LOD. El LOD es la tercera parte del LOQ. El LOQ se calculó por medio de la fórmula.

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{P}$$

Donde:

- $\sigma$  es la desviación estándar de la respuesta
- P es la pendiente

Rango: Se determinó el intervalo entre la concentración mayor e inferior de una muestra donde el método demostró ser exacto, preciso y lineal. El método cumplió con una linealidad desde el LOQ hasta el 150% del criterio de aceptación (ARL).

### 5.3 Observaciones de los recobros

En la determinación del método para cada superficie, se tienen ciertas observaciones:

- **Superficie Acero:** Esta superficie ha mostrado una mayor recuperación en comparación con las superficies de pared, piso y ventana. Esto demuestra la capacidad higiénica del acero inoxidable en los equipos, y la más importante.
- **Superficie Pared:** Esta superficie mostró la menor recuperación de las cuatro superficies. Una de las razones atribuibles a esta observación, es que el acabado de la pintura epóxica por aspersion, genera una superficie irregular, que conlleva a una pequeña acumulación de principio activo y por tanto una baja recuperación del mismo, ya sea en la limpieza o muestreo de la superficie. Esta superficie es más susceptible a la fuerte abrasión y creará cavidades microscópicas de deposición de suciedad. Esta situación conlleva a un desgaste y pérdida de función de la superficie. En la figura 5.6 se puede observar la abrasión presente en la placa modelo en comparación con las superficies restantes.
- **Superficie Piso:** Esta superficie tiene una recuperación mejor que la de pared, debido a que el acabado de la resina epóxica autonivelante crea una superficie muy lisa y por tanto más higiénica. Una observación a este punto es que el piso epóxico a pesar de ser más resistente a la abrasión, no está exento de sufrirla, y con el paso del tiempo se tendrá un piso que pierde capacidad higiénica. Por esta razón es necesario también asegurar que el método de determinación considere un piso con un uso medio. En caso de tener un piso epóxico cuya recuperación no es efectiva, se deberá poner

gran atención, pues esto indicará que el piso no es adecuado para tal objetivo. En la figura se observa una superficie epóxica de aplicación reciente. Su característica autonivelante es clara.

- **Superficie Ventana:** Esta superficie es la más lisa de todas y a nivel molecular, como ya antes se revisó la adhesión al vidrio puede ser variable a causa de la humedad depositada en la capa más externa del vidrio, de modo que la adhesión de los residuos puede ser también mayor, y en consecuencia una recuperación del mismo es variable.

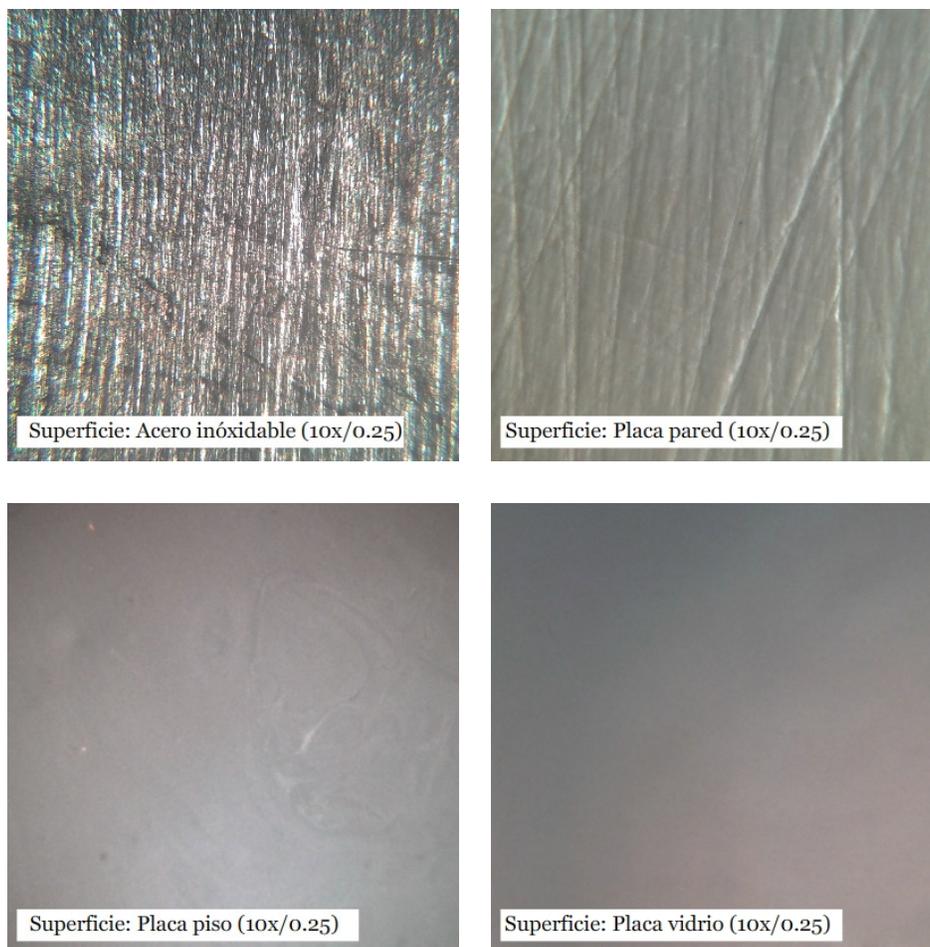


Fig. 5.6. Rugosidad de superficies acero, pared, piso y ventana.

## 6. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico por HPLC para la detección de trazas de un fármaco específico (nistatina) en superficies de acero, pared, piso y ventana, posteriores a una limpieza. Los estudios de validación muestran que el método es selectivo, lineal, preciso y exacto. Los estudios de recuperación que evaluaron los métodos con hisopo y agua de enjuague, fueron aceptables para la recuperación de residuos, además de que no hubo interferencia por parte del hisopo. Se cumplieron requisitos necesarios para un desarrollo sistemático y científico del método analítico, para demostrar a las agencias regulatorias que dicho método fue desarrollado y validado en cada etapa, y que es adecuado para asegurar la comercialización de productos seguros.

En el manejo de recuperación de impurezas en superficies es necesario realizar un estudio amplio para conocer las características de fabricación, acabado y deterioro de la superficie, pues estas características ayudarán a determinar la efectividad de la limpieza y la determinación precisa y robusta de las impurezas depositadas. Es necesario la revisión y el apego a normas de un país al que impacta la validación.

Se recomienda revisar los documentos y guías oficiales relacionados a la validación de otros sistemas u otros tipos de procedimientos analíticos.

Es importante hacer notar que la validación de métodos es necesaria para cumplir con las Buenas Prácticas de Fabricación y de Laboratorio, para satisfacer los requerimientos regulatorios, y para asegurar que la información utilizada para aprobar la calidad de medicamentos es exacta y que los pacientes puedan recibir medicamentos para mejorar su calidad de vida sin comprometer su bienestar y su seguridad.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **Hammond, Bryan y Payne, Philip.** *Pharmaceutical Formulation & Quality. Contamination Control/ Cleaning Validation.* [En línea] Enero, Diciembre de 2009. [Citado el: 14 de Marzo de 2011.] <http://www.pharmaquality.com/ME2/Audiences/dirmod.asp?sid=325598564E8C4B3EB736C7159241312D&nm=Browse+Articles&type=Publishing&mod=Publications%3A%3AArticle&mid=D3E3C719D8D44216836DCA4F4144BEC4&tier=4&id=53473E55514C469B8EC53D36DE7ACE64&AudID=5648A5C28C974>.
2. **Lingenfelter, Eric A., y otros.** *Pharmaceutical Formulation & Quality. How to improve cleaning processes.* [En línea] Junio de 2009. [Citado el: 14 de Marzo de 2011.] <http://www.pharmaquality.com/ME2/Audiences/dirmod.asp?sid=325598564E8C4B3EB736C7159241312D&nm=Browse+Articles&type=Publishing&mod=Publications%3A%3AArticle&mid=D3E3C719D8D44216836DCA4F4144BEC4&tier=4&id=5DB489674CD1409090052D09AB198A18&AudID=5648A5C28C974>.
3. **SSA, COFEPRIS.** *Norma Oficial Mexicana, NOM-059-SSA1-2006, Buenas Prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.* México : Diario Oficial de la Federación, 2008.
4. **Shabir, Ghulam A.** *Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the ICH.* 987, s.l. : Elsevier Science B.V., 2003, *Journal of Chromatography A*, págs. 57-66.
5. **Lakshmana Prabu, S. y Suriyaprakash, T.N.K.** *Cleaning Validation and its importance in Pharmaceutical Industry.* 07, Julio de 2010, *Pharma Times*, Vol. 42, págs. 21-24.
6. **Harmonization, Intrnational Conference of.** *Guideline for industry, Text on Validation of Analytical Procedures, ICH-Q2A.* Estados Unidos : ICH, 1995.
7. **Harmonization, International Conference of.** *Guideline for industry, Q2B Validation of analytical procedures: Methodology.* Estados Unidos : ICH, 1996.
8. **FDA.** *Guide to inspections, Validation of Cleaning Processes.* Estados Unidos : FDA, 2010.
9. **LeBlanc, Destin A.** *Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing.* Estados Unidos : Interpharm/CRC, 2000.
10. **Ahuja, Santinder, y otros.** *Separation Science and Technology.* Moreton, UK : Elsevier Inc., 2011.
11. **Cox Gad, Shayne.** *Pharmaceutical Manufacturing Handbook, Regulations and Quality.* Cary, North Carolina : Wiley-Interscience, 2008.

12. **Imtiaz Haider, Syed.** *Validation Standard Operating Procedures, A step by step guide for achieving compliance in the pharmaceutical devices and biotech industries.* Estados Unidos : St. Lucie Press, 2002.
13. **Riley, Christopher M.** *Development and validaion of analytical mehods, Vol. 3.* UK. : Elsevier Science Ltd., 1996.
14. **W. Dong, Michael y Ahuja, Satinder.** *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC, Vol. 6.* Londres. UK. : Elsevier Ltd., 2005.
15. **Nozal, María J., y otros.** *Development and validation of a liquid chromatographic method for determination of lacidipine residues on surfaces in manufacture of pharmaceuticals.* Valladolid, España : Elsevier, 2003.
16. **McLaughlin, Malcolm C. y Zisman, Alan S.** *The Aqueous Cleaning Handbook. A guide to critical Cleaning procedures, technics, and validation.* New York, Estados Unidos : Thechnical Communiations, 2002.
17. **Española, Real Academia.** Diccionario de la lengua española. [En línea] 2012. <http://buscon.rae.es/drae/>.
18. **FDA, U.S. Department of Health & Human Services.** Medical Devices, 4. Process Validation. [En línea] <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/PostmarketRequirements/QualitySystemsRegulations/MedicalDeviceQualitySystemsManual/ucm122439.htm>.
19. **Mittal, K.L.** *Surface Contamination and Cleaning, Volume 1.* Boston : VSP, 2003.
20. **FDA y Convention, The United States Pharmacopeial.** *La Farmacopea de Estados Unidos–Formulario Nacional (USP32–NF27)* . Twinbrook Parkway, Rockville, Maryland 20852-1790, USA : Webcom Limited, Toronto, Ontario., 2009.
21. **O'Neil, Maryadele J.** *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, And Biologicals.* s.l. : Merck & Co., 2006.
22. **Company, BMS One.** *Nystatin Co.A., Acceso restringido.*
23. PLM México 2011, **Diccionario de Especialidades Farmacéuticas - Ed. Thompson PLM.**
24. **Interational Stainless Steel Forum (ISSF),** The stainless steel family. [En línea] 2012. <http://www.worldstainless.org/Files/issf/non-image-files/PDF/TheStainlessSteelFamily.pdf>

25. **Jean-Pierre Pascault and Roberto J. J. Williams**, Epoxy Polymers, New Materials and Innovations, 2010, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
26. **K. J. Rao**, Structural Chemistry of Glasses, Elsevier Science & Technology Books, 2002
27. **A.V. Pocius**, Adhesion Science And Engineering - 2: Surfaces, Chemistry And Applications, M. Chaudhury, Department of Chemical Engineering Center for Polymer Interfaces, Lehigh University, Elsevier, 2002