



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CICLO DE VIDA DE MÉTODOS ANALÍTICOS
BASADO EN CALIDAD ANALÍTICA POR DISEÑO
(AQbD)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

PRESENTA:

EDGAR BARRIENTOS CRUZ



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2024



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: Dra. Inés Fuentes Noriega
VOCAL: M en C. Juan Manuel Rodríguez
SECRETARIO: QFB. Ma. De los Dolores Campos Echeverria
1er. SUPLENTE: QFB. Irma José Núñez
2do. SUPLENTE: M en C. José Mojica Reyes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 113, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de
Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Inés Fuentes Noriega

SUSTENTANTE

Edgar Barrientos Cruz

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química, por abrirme sus puertas, formarme personal, académica y profesionalmente.

A la Dra. Inés Fuentes, gracias por aceptar dirigir este trabajo y enriquecerlo de la mejor manera posible, asimismo, por su paciencia durante todo el proceso.

Al M en C. Juan Manuel Rodríguez, por su grata disposición para la revisión de este trabajo. Gracias por sus recomendaciones.

A la profesora María de los Dolores Campos, por su interés en este trabajo y sus atinadas recomendaciones para enriquecer este proyecto.

A cada uno de mis profesores de la carrera, hoy que miro atrás recuerdo cada una de sus enseñanzas con melancolía y admiración.

DEDICATORIA

Esto es por y para ustedes. Por su cariño, por su apoyo, por su paciencia, por sus risas, por sus lágrimas, por compartir este sueño, pero, sobretodo... Por no dejarme y permitirme seguir.

Con mucho afecto...

A mis amigos de toda la vida: Alejandra Arroyo, María Ruíz, Abiel Morales y Ricardo Jiménez.

A mis amigas del Instituto de Química: M en C. Alejandra Arista y QFB Magaly Rodríguez.

A mis amigos de la carrera; QA Francisco Espinosa, QA Lorena Castro, QFB Michel Pino, QFB Emily Rosaslanda, QFB Karla Pérez, QFB Arelly Pacheco y QA Rocío Berrocal.

A mis amigos que, aunque no formaron parte de mi vida universitaria, me han hecho ser el profesional que hoy soy: Yael Mendoza, IBI Cristian Arenas, IQ Nicolás Cortés, QFB Aldhair Badillo, IQ Uriel Peralta, IQI Jacqueline Araiza, QFBT Adolfo Falcón, IBI Diana Hernández, QFI Eric Vega, Ilse García, IBI Mario Mendez, QFB Omar Rojas y mi máster José López.

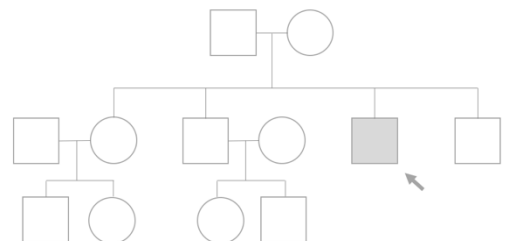
A mis mejores amigas: QFB Mayra Wulfrano, QFB Danaé Maya y Psic. Cristian Flores.

A mi familia; mis tías: Alma Cruz y Martha Barrientos. Mis cuñados: Jorge Tavera y Evelyn Ramírez. Mis sobrinos: Bayron, Yanel, Alison y Emiliano. Mis hermanos: Diego, Paty y Pepe.

Principalmente, y con mayor afecto, a mis padres: Martha y Manuel.

“Algunas veces, una canción de cuatro minutos y veintisiete segundos puede darte más respuestas que una persona. Y personas que, con mirarte, te hacen sentir como el mejor concierto de tu vida.”

Defreds



ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	V
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE ECUACIONES.....	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
GLOSARIO.....	IX
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	12
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	12
REFERENCIAS REGULATORIAS NACIONALES E INTERNACIONALES.....	13
CAPÍTULO 2. PRINCIPIOS DE LA GESTIÓN DEL CICLO DE VIDA DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	15
GENERACIÓN DE CONOCIMIENTO Y PERFIL ANALÍTICO OBJETIVO (ATP)	15
ESPECIFICACIONES Y REGLAS DE DECISIÓN.....	18
CAPÍTULO 3. PRERREQUISITOS PARA EL CICLO DE VIDA DEL MÉTODO ANALÍTICO	21
INSTALACIONES	21
EQUIPOS.....	21
SUSTANCIAS DE REFERENCIA	22
REACTIVOS.....	23
ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL ANALÍTICO	24
CAPÍTULO 4. MÉTODOS ANALÍTICOS	25
CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	25
PROTOCOLO DE VALIDACIÓN.....	27
CAPÍTULO 5. CICLO DE VIDA DEL MÉTODO ANALÍTICO	30
ETAPA 1: DISEÑO Y DESARROLLO DE MÉTODOS	30
Aplicación de los principios de AqBd.....	30
Proceso de diseño y desarrollo de métodos	38
Robustez y tolerancia.....	43
ETAPA 2: CALIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO	44
Selectividad.....	44
Linealidad.....	45
Exactitud.....	45

Precisión.....	46
Límite de detección	47
Límite de cuantificación	48
Pruebas de idoneidad del sistema.....	48
Requisitos de verificación y transferencia para métodos analíticos calificados	49
ETAPA 3: VERIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL PROCEDIMIENTO PARA EL MANTENIMIENTO DEL ESTADO VALIDADO.....	52
Requisitos para el control de rutina de los métodos analíticos	52
Análisis de tendencia utilizando herramientas estadísticas de control de procesos.....	56
CAPÍTULO 6. APLICACIÓN DE AqBd EN CASO DE ESTUDIO	61
CASO DE ESTUDIO	61
Generación de conocimiento y Perfil Analítico Objetivo.....	61
Gestión de riesgos.....	63
Proceso de diseño del método	64
Robustez y optimización del método analítico	67
Verificación del desempeño del método analítico	76
CONCLUSIONES.....	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviatura/ Acrónimo	Significado
ACS*	Estrategia de Control Analítico (Analytical Control Strategy)
AQbD*	Calidad Analítica por Diseño (Analytical Quality by Design)
ATP*	Perfil del Objetivo Analítico (Analytical Target Profile)
CAPA	Acciones preventivas, acciones correctivas
CCAYAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura
CDER*	Centro de Evaluación e Investigación de Fármacos
CNQFBM	Colegio Nacional de Químicos Farmacéutico-Biólogos de México, A.C.
CQA*	Atributo Crítico de Calidad (Critical Quality Attribute)
DOE*	Diseño Estadístico de Experimentos (Design Of Experiments)
EMA*	Agencia de Medicamentos Europea
FDA*	Administración de Alimentos y Medicamentos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FMEA*	Análisis de Modos y Efecto de Fallas
FMEAC*	Análisis de efectos de modo de falla/Efectos de modo de falla y análisis de criticidad
HPAEC PAD*	Cromatografía de Alto Rendimiento e Intercambio Aniónico con Detección de Pulso Amperométrico (High Performance Chromatography and Anion Exchange with Amperometric Pulse Detection)
HPLC*	Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento (High Performance Liquid Chromatography)
ICH*	Conferencia Internacional sobre Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use)
ISO*	Organización Internacional para la Estandarización (International Organization for Standardization)
LC	Límite de Cuantificación (Quantification Limit)
LD	Límite de detección (Detection Limit)
LSL*	Límite de Especificación Inferior (Lower Specification Limit)
MEKC*	Cromatografía Electrocinética Micelar (Micellar Electrokinetic Capillary)
MODR*	Región de Diseño Operativo del Método (Method Operable Design Region)
OFAT*	Método de Un factor a la vez (Once Factor At Time)
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OOE*	Resultados Fuera de Expectativa (Results Outside of Expectations)
OOS*	Resultados Fuera de Especificación (Results Out of Specification)
OOT*	Resultados Fuera de Tendencia (Off-Trend Results)
PAR*	Rangos de Parámetros de Métodos Analíticos (Analytical Method Parameter Ranges)
QbD*	Calidad por Diseño (Quality by Design)
QRM*	Gestión de Riesgo de la Calidad (Quality Risk Management)
QTPP*	Perfil Objetivo de Calidad de Producto (Quality Target Product Profile)
RAP	Revisión Anual de Producto
SL*	Límite de Especificación (Specification Limit)
SST*	Adecuabilidad del Sistema (System Suitability System)
TPWII*	Estación de Trabajo de Procesamiento de Tabletas
UNODC*	Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
USL*	Límite de Especificación Superior (Upper Specification Limit)
USP*	Farmacopea de los Estados Unidos de América

* Por sus siglas en inglés.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
I	Marco regulatorio aplicable a métodos analíticos en el ámbito nacional e internacional	14
II	Parámetros de desempeño utilizados en la Validación de métodos analíticos	27
III	Evaluación de parámetros de desempeño en un método analítico en función de su aplicabilidad analítica	28
IV	ATP para análisis de polisacárido libre (no conjugado) en una vacuna	32
V	ATP para un método analítico de extracción	33
VI	Ejemplo de un mapa de calor de una evaluación del riesgo de los pasos de preparación de una muestra y configuración de un HPLC de un método analítico	36
VII	Propiedades fisicoquímicas de Furosemida y Espironolactona	62
VIII	Factores y niveles para diseño de experimentos de optimización del método analítico de Disolución para Furosemida/Espironolactona Cápsulas.	68
IX	Resumen de experimentos para la optimización del método analítico de Disolución para Furosemida/Espironolactona Cápsulas.	69

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación	Nombre	Página
I	Ecuación de Henderson-Hasselbach	37
II	Cálculo de Índice Ppk para procesos de manufactura	55
III	Cálculo de valor P/TOL	55
IV	Cálculo de valor Z	55

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
I	Resultados de las tres etapas del Ciclo de vida del desarrollo de métodos analíticos	16
II	Uso de la regla de aceptación simple	19
III	Uso de la regla de Banda de seguridad	19
IV	Regla de decisión con procedimiento de dos etapas	20
V	Regla de decisión con resultados condicionales o no concluyentes	20
VI	Diagrama de Ishikawa utilizado para identificar posibles variables en un método analítico	35
VII	Ejemplo de diagrama de Superficie de respuesta para un diseño de experimentos de tres factores	40
VIII	Ejemplo de diagrama de Diseño de mezcla para tres factores.	42
IX	Mapa de resolución generado con modelo mecanístico	42
X	Fuentes de variabilidad del producto y método analítico	54
XI	Ejemplo de Gráficos control	56
XII	Estructura química de Furosemida	62
XIII	Estructura química de Espironolactona	62
XIV	Identificación de riesgos en el método analítico de Disolución de Furosemida/Espironolactona en un diagrama Causa-raíz	63
XV	Metabolismo de Espironolactona a sus principales metabolitos.	64
XVI	Perfil de Solubilidad vs pH de Furosemida	65
XVII	Diagrama de distribución de especies en función del pH de Furosemida	66
XVIII	Perfil de Solubilidad vs pH de Espironolactona	66
XIX	Perfil de Solubilidad vs pH de Canrenona	66
XX	Aleatorización de experimentos para optimización del método analítico de Disolución de Furosemida/Espironolactona	68
XXI	Etiquetas de experimentos para la optimización del método analítico de Disolución para Furosemida/Espironolactona Cápsulas	69

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
XXII	Análisis estadístico del Diseño de Experimentos de Furosemida	70
XXIII	Gráficos de interacción de factores en el Diseño de Experimentos de Furosemida	71
XXIV	Gráficos de superficie en el Diseño de Experimentos de Furosemida	72
XXV	Gráficos de contorno en el Diseño de Experimentos de Furosemida	72
XXVI	Análisis estadístico del Diseño de Experimentos de Espironolactona	73
XXVII	Gráficos de interacción de factores en el Diseño de Experimentos de Espironolactona	74
XXVIII	Gráficos de superficie en el Diseño de Experimentos de Espironolactona	74
XXIX	Gráficos de contorno en el Diseño de Experimentos de Espironolactona	75
XXX	Cromatogramas tipo de Solución estándar y Solución muestra de Furosemida/Espironolactona Cápsulas	77

GLOSARIO

✿ **Aditivo¹**

Toda sustancia que se incluya en la formulación de los medicamentos y que actúe como vehículo, conservador o modificador de alguna de sus características para favorecer su eficacia, seguridad, estabilidad, apariencia o aceptabilidad.

✿ **Analito²**

Sustancia que debe identificarse o medirse.

✿ **Atributo Crítico de Calidad³**

Es una propiedad o característica física, química, biológica o microbiológica que debe estar dentro de un límite, rango o distribución apropiados para garantizar la calidad deseada del producto.

✿ **Calibración¹**

Demostración de que un instrumento particular o dispositivo produce resultados dentro de límites especificados, en comparación con los producidos por una referencia o estándar trazable sobre un intervalo de mediciones establecido.

✿ **Calificación de personal⁴**

Realización de las pruebas específicas basadas en conocimiento científico, para demostrar que los equipos, sistemas críticos, instalaciones, personal y proveedores cumplen con los requisitos previamente establecidos, la cual debe ser concluida antes de validar los procesos.

✿ **Colorimetría⁵**

Técnica basada en la medida de la absorción de radiación en la zona visible por sustancias coloreadas.

✿ **Curtosis estandarizada⁶**

Medida que define qué tan pronunciada es la punta (o pico) en una distribución.

✿ **Desviación/No conformidad⁴**

No cumplimiento de un requisito previamente establecido.

✿ **Diseño Estadístico de Experimentos⁷**

Técnica estadística sistemática cuyo objetivo es realizar una serie de pruebas en las que se inducen cambios deliberados para averiguar si determinados factores influyen en la variable de interés o de estudio y, si existe influencia de algún factor en el proceso o producto, cuantificarla.

✿ **Fármaco⁸**

Toda sustancia natural, sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presente en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.

✿ **Fracción disconforme⁹**

Cociente del número de artículos disconformes de una población entre el número total de artículos que contiene esta.

✿ **Gestión de Riesgo de Calidad¹⁰**

Proceso sistemático para la evaluación, control, comunicación y revisión del riesgo para la calidad del valor de informe durante todo el ciclo de vida del procedimiento analítico.

✿ **Hoja de Trabajo Analítico¹¹**

Documento interno en formulario impreso para registrar información sobre la muestra, los procedimientos de ensayo y los resultados del análisis. Puede ser complementada con los datos crudos obtenidos en el análisis.

✿ **Idoneidad del sistema¹²**

Verificación de que el sistema (instrumento, analista, equipo, sustancia de referencia, entre otros) opera con base a criterios preestablecidos, que permitan asegurar la confiabilidad de los resultados de un método analítico.

✿ **Método analítico¹²**

Descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra.

✿ **Método Indicativo de Estabilidad¹³**

Método validado por el fabricante o por quien éste designe, que puede detectar cambios en el tiempo de las propiedades químicas o biológicas del fármaco o medicamento; son específicos para el contenido del fármaco, productos de degradación y otros compuestos de interés.

✿ **Perfil de Producto Objetivo de Calidad³**

Un resumen prospectivo de las características de calidad de un producto farmacéutico que idealmente se logrará para garantizar la calidad deseada, teniendo en cuenta la seguridad y la eficacia del producto farmacéutico.

✿ **Perfil del Objetivo Analítico¹⁴**

Consta de una descripción del propósito previsto, detalles apropiados sobre los atributos del producto que se van a medir y las características de desempeño relevantes con los criterios de desempeño asociados.

✿ **Placebo¹**

Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del fármaco.

✿ **Programa Anual de Estabilidad¹³**

Estudios diseñados para monitorear anualmente, la estabilidad del fármaco, del medicamento o remedio herbolario a partir de lotes de producción, bajo las condiciones de estabilidad a largo plazo.

✿ **Potenciometría¹⁵**

Medición del potencial de un sistema electroquímico en equilibrio para determinar la concentración de algunas sustancias.

✿ **Preparado farmacéutico¹⁶**

Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y que se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.

✿ **Producto a granel⁴**

Producto en cualquier etapa del proceso de producción antes de su acondicionamiento primario.

✿ **Producto terminado⁴**

Medicamento en su presentación final.

✿ **Región de Diseño Operativo del Método¹⁰**

Espacio multivariante de los parámetros del procedimiento analítico que garantiza el cumplimiento con el Objetivo de Perfil Analítico (ATP) y, por lo tanto, proporciona una garantía de la calidad del valor medido.

✿ **Resultados Fuera de Especificación¹⁷**

Todos los resultados de pruebas que quedan fuera de las especificaciones o criterios de aceptación establecidos en las solicitudes de medicamentos, archivos maestros de medicamentos (DMF), compendios oficiales o por el fabricante. También se aplica a todas las pruebas de laboratorio en proceso que están fuera de las especificaciones establecidas.

✿ **Resultados Fuera de Expectativa¹⁸**

Resultado atípico, aberrante o anómalo dentro de una serie de resultados recopilados durante un corto período de tiempo. Es un resultado que cumple con las especificaciones, pero está fuera de la variabilidad esperada del procedimiento analítico.

✿ **Resultados Fuera de Tendencia¹³**

Dato obtenido del análisis de la muestra de un lote de estabilidad que no sigue la tendencia esperada, en comparación con los resultados analíticos de otras muestras de otros lotes de estabilidad o con respecto a resultados anteriores del mismo lote obtenidos durante el estudio de estabilidad.

✿ **Sesgo¹⁰**

Valor estimado del error sistemático de una medición.

✿ **Sistemas críticos⁴**

Aquellos que tienen impacto directo en los procesos y productos.

✿ **Transferencia de métodos analíticos¹⁹**

Proceso documentado que califica a un laboratorio (unidad receptora) para emplear un procedimiento de prueba analítico que se originó en otro laboratorio (unidad emisora), con lo que se asegura que la unidad receptora cuenta con el conocimiento adecuado sobre el procedimiento y la capacidad para llevar a cabo el procedimiento analítico transferido según lo previsto.

✿ **Transferencia de tecnología⁴**

Proceso sistemático que es seguido para pasar el conocimiento y la experiencia durante el desarrollo y/o comercialización a otra unidad responsable y autorizada. Este proceso incluye la transferencia de documentación y la capacidad demostrada de la unidad receptora del desempeño efectivo de los elementos críticos de la tecnología transferida hasta la satisfacción de todas las partes y cumplimiento de la normativa vigente.

✿ **Validación de Métodos analíticos²⁰**

Una evaluación de conocimientos previos, datos o experimentos deliberados para determinar la idoneidad de un procedimiento analítico para su propósito previsto.

✿ **Verificación de Métodos analíticos²¹**

Evaluación documentada que sirve para determinar si el procedimiento farmacopeico puede ser utilizado para su propósito previsto, en las condiciones de uso reales para un fármaco específico y/o una matriz de un producto farmacéutico determinado.

✿ **Volumetría²²**

Tratamiento de una sustancia soluble en solución, y contenida en un recipiente adecuado, con una solución estandarizada apropiada, donde el punto final se determina en forma instrumental, o visualmente con ayuda de un indicador adecuado.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Actualmente el desarrollo de métodos analíticos se ha convertido en una actividad que ha cobrado suma relevancia dentro de la Industria farmacéutica. El desconocimiento tanto de la funcionalidad de un método analítico, así como de las actividades posteriores al desarrollo de este (Validación, Transferencia, etc.) repercute en Resultados Fuera de Especificación (OOS), Resultados Fuera de Tendencia (OOT) y Resultados Fuera de Expectativa (OOE). Por consiguiente, ocasiona tiempos de retraso en liberación de lotes de fabricación, en reanálisis de lotes de Plan Anual de Estabilidad, e incluso en análisis de Nuevos Productos. Además, genera desconocimiento acerca de procesos de mejora y robustez del proceso de fabricación y la calidad del producto en cuestión.^{23,24,25}

Se ha generado un nuevo concepto en la Industria farmacéutica acerca del ciclo de vida de métodos analíticos enfatizando la importancia de contar con conocimientos científicos sólidos y una gestión de riesgos de calidad para el desarrollo, establecimiento, uso y control de procedimientos analíticos. Este concepto es aplicable a todos los tipos de procedimientos analíticos y debe ser consistente con la complejidad del procedimiento y la criticidad del atributo de calidad que se quiere medir con el procedimiento analítico.^{10,24,25}

La guía ICH Q8 define Calidad por Diseño (QbD) como "un enfoque sistemático para el desarrollo que comienza con objetivos predefinidos y enfatiza la comprensión de productos y procesos y el control de procesos, basado en una sólida ciencia y gestión de riesgos de calidad", es decir, el enfoque puede aplicar desde la etapa de desarrollo del producto, hasta la discontinuación del producto.³

La implementación de Calidad por diseño (QbD) se ha hecho obligatoria en algunos países, especialmente por la EMA (Agencia Europea de Medicamentos) y otros países pertenecientes al Consejo Internacional de Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH por sus siglas en inglés).

Asimismo, la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América (USP) en el 2016 declaró la propuesta un nuevo Capítulo General, titulado, <1220> “El Ciclo de Vida de los Procedimientos Analíticos”, el cual es consistente con los conceptos de calidad por diseño (QbD) como se describe en las guías Q8, Q9, Q10 y Q14 de la ICH.

OBJETIVOS

- ✿ Dar a conocer el concepto de Calidad Analítica por Diseño (AQbD) y su aplicación en el desarrollo de métodos analíticos.
- ✿ Integrar los conceptos de desarrollo, la validación, transferencia y verificación de métodos analíticos en la totalidad del ciclo de vida del proceso analítico
- ✿ Concientizar sobre la importancia del correcto desarrollo de métodos analíticos para asegurar que el procedimiento es adecuado para el uso que se pretende y dando cumplimiento regulatorio.
- ✿ Unificar las herramientas de Calidad por Diseño (AQbD) y Gestión de riesgos para el desarrollo de métodos analíticos.

REFERENCIAS REGULATORIAS NACIONALES E INTERNACIONALES

Hoy en día, el desarrollo de métodos analíticos no se encuentra regulado, sin embargo, existen documentos nacionales e internacionales en los que se describe cómo se debe realizar la Validación, Verificación y Transferencia de métodos analíticos. Frecuentemente se realizan revisiones de estos documentos haciéndolos cada vez más exigentes para poder elaborar un medicamento seguro, eficaz y de calidad. En la **Tabla I** se enlistan algunos documentos regulatorios aplicables al Desarrollo de métodos analíticos.

Tabla I. Marco regulatorio aplicable a métodos analíticos en el ámbito nacional e internacional.

Instancia	Nombre	Tipo
FEUM	Apéndice III. Validación de métodos analíticos. Recomendaciones para su presentación ante la FEUM.	Normativo
FEUM	Apéndice IV. Estimación de la incertidumbre de métodos analíticos farmacopeicos.	Informativo
FEUM	Apéndice X. Transferencia de métodos analíticos	Informativo
Secretaría de Salud	NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad	Normativo
CNQFBM A.C.	Guía de Validación de métodos analíticos	Informativo
Secretaría de Salud	NOM-059-SSA1-2015. Buenas Prácticas de Fabricación	Normativo
CCAYAC	Guía de Verificación de Métodos Analíticos	Informativo
USP	<1210> Métodos estadísticos para la Validación de procedimientos analíticos	Normativo
USP	<1224> Transferencia de métodos analíticos	Normativo
USP	<1225> Validación de procedimientos farmacopeicos	Normativo
USP	<1226> Verificación de procedimientos farmacopeicos	Normativo
ICH	ICH Q2. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology	Informativo
ICH	ICH Q14. Analytical Procedure Development and Revision of Q2 (R1) Analytical Validation	Informativo
CDER (FDA)	Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. Guidance for Industry	Informativo
UNODC (ONU)	Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos	Informativo
EURACHEM	La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos	Normativo

CAPÍTULO 2. PRINCIPIOS DE LA GESTIÓN DEL CICLO DE VIDA DEL PROCEDIMIENTO ANALÍTICO

GENERACIÓN DE CONOCIMIENTO Y PERFIL DEL OBJETIVO ANALÍTICO (ATP)

La gestión o generación del conocimiento es un enfoque sistemático para adquirir, analizar, almacenar y difundir información relacionada con productos, procesos de fabricación y componentes.

Las fuentes de conocimiento incluyen, pero no se limitan a, conocimiento previo (dominio público o documentado internamente); estudios de desarrollo farmacéutico; actividades de transferencia de tecnología; estudios de validación de procesos durante el ciclo de vida del producto; experiencia en fabricación; innovación; mejora continua; y actividades de gestión del cambio.

El conocimiento del producto y del proceso debe administrarse desde el desarrollo a través de la vida comercial del producto hasta la interrupción del producto inclusive. Con respecto a métodos analíticos, la generación de conocimiento se lleva a cabo en todo el Ciclo de vida de este, el cual incluye el Perfil del Objetivo Analítico (ATP, por sus siglas en inglés) y por tres etapas:

✿ **Etapa 1. Diseño del procedimiento analítico:**

Comprende el desarrollo del procedimiento, el cual consiste en la tecnología analítica, la preparación de la muestra, la comprensión del proceso obtenida mediante la recopilación de conocimiento, experimentos sistemáticos de desarrollo del procedimiento, evaluaciones de riesgos y experimentos de laboratorio asociados.

✿ **Etapa 2. Calificación del desempeño del método analítico:**

La calificación del desempeño del procedimiento consiste en estudios diseñados para demostrar que el procedimiento es apto para su propósito previsto. Esto implica la confirmación de que los valores de informe generados mediante la aplicación del procedimiento analítico cumplen los criterios del ATP, así como la confirmación de las características de

desempeño del procedimiento mediante estudios tradicionales de validación, verificación, o transferencia.

✿ **Etapa 3. Verificación del desempeño del método analítico:**

Implica el monitoreo del procedimiento analítico durante el uso de rutina y la confirmación de que el desempeño sigue cumpliendo los criterios del ATP. El monitoreo garantiza que el desempeño del procedimiento se mantiene a un nivel aceptable a lo largo de toda la vida útil del procedimiento. También puede ofrecer una indicación temprana de posibles problemas de desempeño o tendencias adversas y ayudar a identificar cambios necesarios en el procedimiento analítico.³

Los resultados de cada una de las etapas del Ciclo de vida de un método analítico se resumen en la **Figura I:**

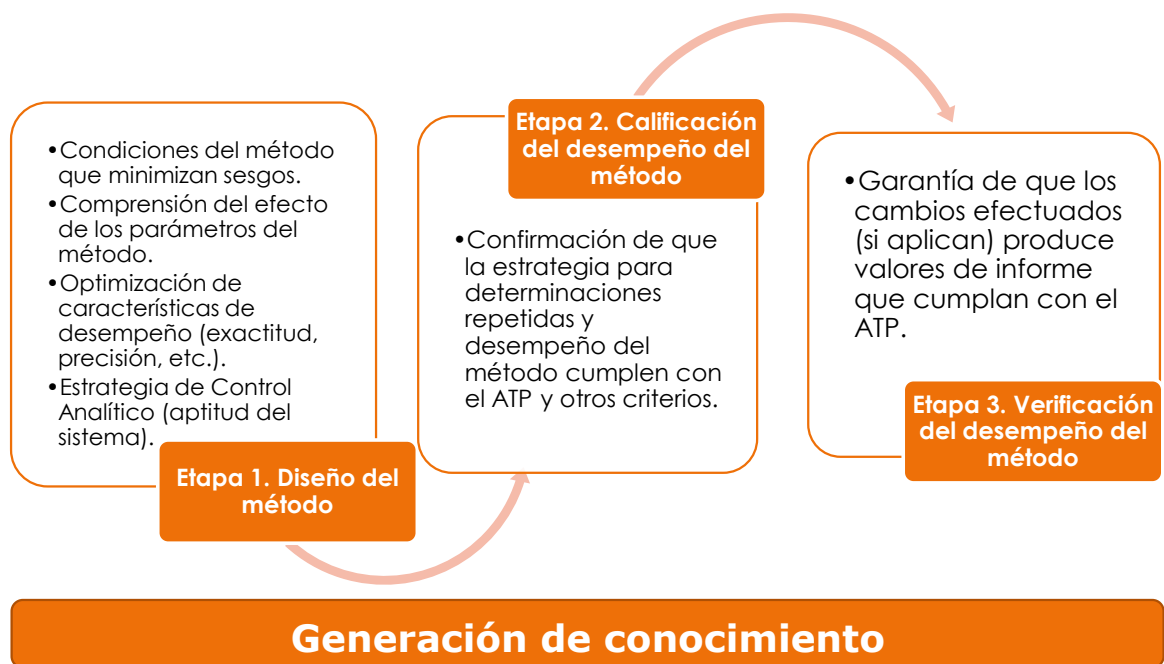


Figura I. Resultados de las tres etapas del Ciclo de Vida del desarrollo de métodos analíticos.¹⁰

Algunos ejemplos de fuentes de conocimiento son:

- ✿ Conocimiento previo basado en la experiencia obtenida de procesos similares (conocimiento interno, publicaciones científicas y técnicas de la industria) e información publicada (conocimiento externo: literatura y publicaciones)
- ✿ Estudios de desarrollo farmacéutico

PRINCIPIOS DE LA GESTIÓN DEL CICLO DE VIDA DEL MÉTODO ANALÍTICO

- ✿ Mecanismo de acción
- ✿ Relaciones estructura/función
- ✿ Actividades de transferencia de tecnología
- ✿ Estudios de validación de procesos
- ✿ Datos de prueba de materias primas
- ✿ Informes de estabilidad
- ✿ Revisiones anuales de productos
- ✿ Informes de eventos adversos
- ✿ Informes de Desviación, Información de Recuperación
- ✿ Investigaciones técnicas y/o informes CAPA
- ✿ Historial del producto e/o historial de fabricación

Aunque la Generación de conocimiento no es auditable en términos regulatorios, debe haber un mecanismo adecuado para reunir todo este conocimiento.

Un primer paso fundamental es asegurarse de que los experimentos de desarrollo de métodos estén adecuadamente documentados con las razones para realizar el experimento y una conclusión basada en los resultados. Los ejercicios como la evaluación de riesgos o la elección del diseño del estudio también deben documentarse adecuadamente, de modo que no se pierda la justificación de las decisiones tomadas.^{3,26,27}

El enfoque que se adopte para recopilar sistemáticamente los conocimientos adquiridos dependerá en gran medida de cuestiones tales como la infraestructura disponible dentro de una organización determinada. Por ejemplo:

- ✿ Registros en papel:
Esto puede verse favorecido por la generación de un informe de desarrollo de método contemporáneo, que enumere, por ejemplo, los experimentos realizados y las conclusiones críticas.
- ✿ Los cuadernos electrónicos ofrecen capacidades de búsqueda, indexación y recuperación mucho mejores que en el papel.
- ✿ Se han propuesto sistemas de gestión de datos especializados para Calidad Analítica por Diseño (AQbD).

El conocimiento recopilado se puede obtener y compartir en un sitio o empresa, entre empresas y proveedores/contratistas, productos y en diferentes disciplinas (por ejemplo, desarrollo, fabricación, ingeniería, unidades de calidad).²³

ESPECIFICACIONES Y REGLAS DE DECISIÓN

La decisión de si un material cumple con una especificación se basa en el uso de una regla de decisión. Una regla de decisión proporciona el nivel aceptable de la probabilidad de tomar una decisión errónea que se puede usar para definir el máximo combinado permisible de sesgo y precisión.¹⁰

La ISO/IEC 17025 define una Regla de decisión como: regla que describe cómo se tiene en cuenta la incertidumbre de la medición al declarar la conformidad con un requisito específico.²⁸

Sobre la base de una regla de decisión, se puede determinar una "zona de aceptación" y una "zona de rechazo", de modo que, si el resultado de la medición se encuentra en la zona de aceptación, el artículo se declara conforme y si se encuentra en la zona de rechazo, se declara no conforme. Los límites de la zona de aceptación se denominan "límites de aceptación".

Una regla de decisión debe tener un método bien documentado para determinar la ubicación de las zonas de aceptación y rechazo, idealmente incluyendo niveles aceptables de probabilidad de que el valor del mensurando se encuentra dentro del límite de especificación o se encuentra fuera del límite de especificación.²⁹

Una consideración para determinar los criterios del ATP es comprender el impacto que tiene el error analítico total en el riesgo asociado con la decisión de que un material cumple una especificación. Se puede usar la incertidumbre de medición o el error analítico total.

El riesgo primario es que la regla de decisión produzca una decisión incorrecta; es decir, que se determine que el material analizado cumple (o no cumple) los límites de una especificación cuando en realidad sucede lo contrario. Este riesgo puede verse influenciado en gran medida por la variabilidad del procedimiento.¹⁰

Existen cuatro tipos de Reglas de decisión²⁹:

✿ Regla de decisión usando aceptación simple:

El ejemplo más simple utiliza el límite de especificación como límite de aceptación, de modo que un resultado dentro del límite se considera conforme. Esto se denomina "aceptación simple" o "riesgo compartido". Esto corresponde a las zonas de aceptación y rechazo, como se muestra en la *Figura II*. Para usar esta regla, generalmente existe el requisito de que la incertidumbre de la medición se haya considerado como aceptable para mantener aceptable el riesgo de tomar una decisión incorrecta.

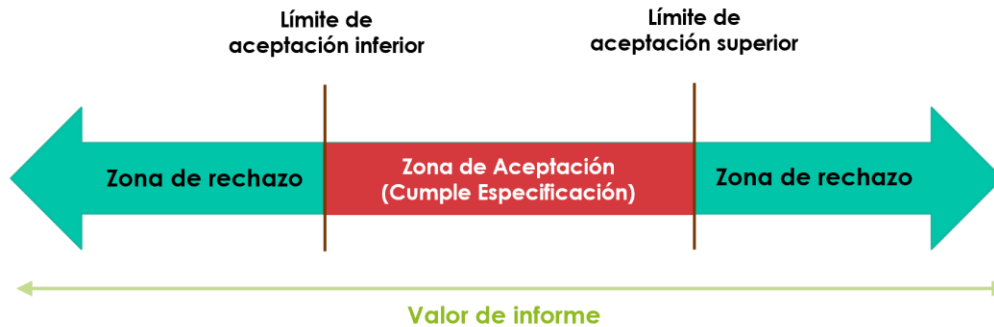


Figura II. Uso de la regla de aceptación simple.

✿ **Regla de decisión usando banda de seguridad:**

Para valores medidos muy cercanos al límite, o cuando la incertidumbre es grande, la aceptación puede conducir a un riesgo muy alto de una decisión incorrecta, para esto es necesario tener más confianza para aceptar o rechazar un elemento de prueba. Para estas situaciones, las zonas de aceptación y rechazo se pueden determinar como se muestra en la **Figura III**. El intervalo entre el límite y el final de la zona de aceptación se denomina “banda de seguridad”, lo que reduce el riesgo de una decisión incorrecta. En general, la banda de seguridad será un múltiplo de la incertidumbre del valor medido.

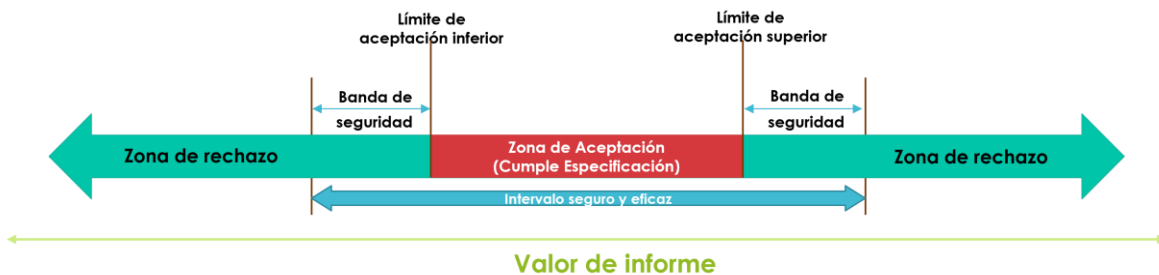


Figura III. Uso de la regla de Banda de seguridad.

✿ **Regla de decisión con resultados condicionales o no concluyentes:**

Algunos procedimientos de decisión pueden incluir la posibilidad de un resultado "condicional" o "no concluyente", generalmente cuando el límite de especificación se encuentra dentro del intervalo de incertidumbre (ver escenarios 2 y 3 en la **Figura V**). Por ejemplo, el escenario 2 podría considerarse como un "fallo condicional" y el escenario 3 podría considerarse como "aprobado condicional". Alternativamente, una regla de decisión podría optar por concluir estos escenarios como "no concluyentes".

En muchos casos, una regla de decisión proporcionará pruebas adicionales en caso de un resultado condicional o no concluyente.

🌸 **Regla de decisión que especifica un procedimiento en dos etapas:**

Para reducir los riesgos de falsa aceptación y/o rechazo, algunas reglas de decisión adoptan un procedimiento de dos etapas, en el que se realizan mediciones adicionales en caso de un resultado no concluyente, como se muestra en la **Figura IV**.

Dichos casos no necesitan usar el mismo procedimiento de decisión en cada etapa. Por ejemplo, para reducir el costo de la evaluación de cumplimiento, se puede realizar primero una regla de decisión de menor costo con una incertidumbre comparativamente grande. Si el resultado inicial no es concluyente o está cerca de un límite, se aplica una regla de decisión de confirmación para producir resultados con una incertidumbre menor. La mayoría de los elementos de la prueba se deciden con la confianza adecuada a bajo costo, mientras que los casos límite se deciden con una prueba más costosa y con mayor confianza.

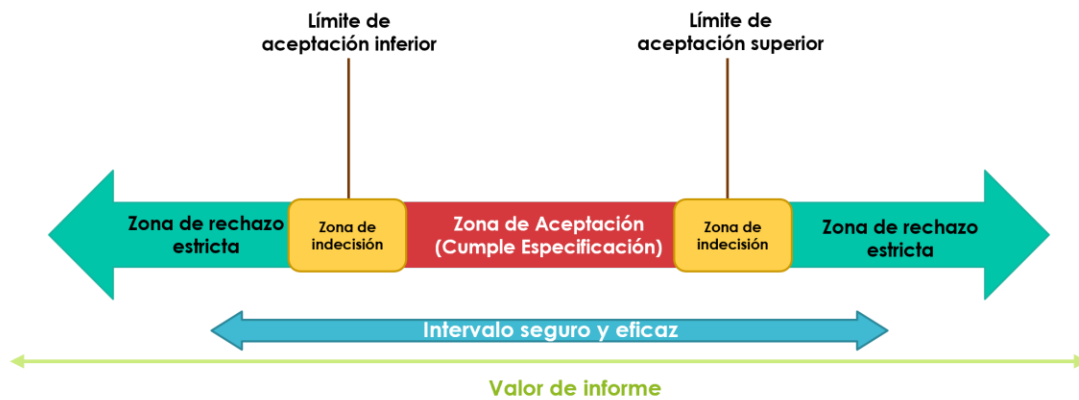


Figura IV. Regla de decisión con procedimiento de dos etapas.

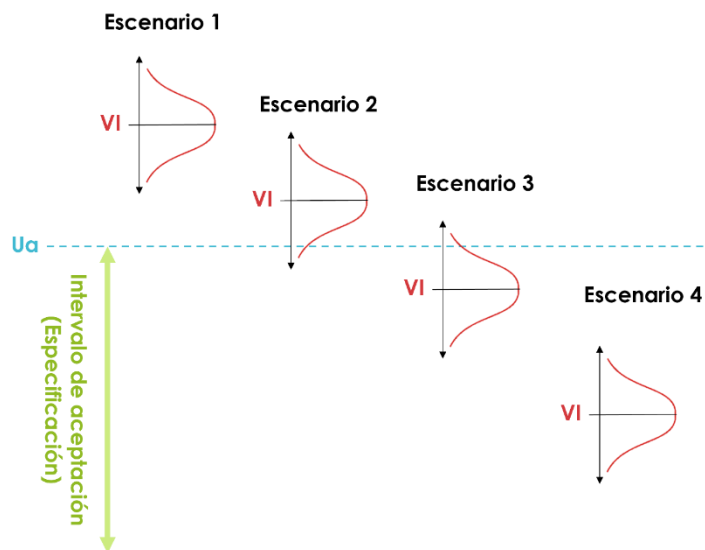


Figura V. Regla de decisión con resultados condicionales o no concluyentes.

CAPÍTULO 3. PRERREQUISITOS PARA EL CICLO DE VIDA DEL MÉTODO ANALÍTICO

INSTALACIONES³³

Las instalaciones de laboratorio deben tener el tamaño, distribución, localización y construcción adecuados. Su diseño debe responder a las funciones y operaciones que realice, como ensayos químicos, fisicoquímicos, microbiológicos y/o biológicos. Las instalaciones deben tener las unidades de laboratorio necesarias para cada propósito en específico. También debe contar con equipo de seguridad adecuado, situado en lugares tales, que sea fácil limpiarlo y darle mantenimiento. El laboratorio debe tener el mobiliario, el equipo y los instrumentos útiles para las actividades que se llevarán a cabo.

Las condiciones ambientales como la iluminación, fuentes de energía, temperatura, humedad, presión de aire, etc., deben ser las vigiladas, controladas y documentadas siguiendo los requisitos técnicos para que no invaliden los resultados ni afecten la calidad de las mediciones.

EQUIPOS³³

Los equipos, instrumentos y otros dispositivos deben ser diseñados, construidos, adaptados, ubicados, calibrados, calificados y verificados según las operaciones del laboratorio.

El proveedor de equipos, instrumentos y otros dispositivos debe tener capacidad de brindar soporte técnico y mantenimiento para asegurar que las mediciones sean confiables,

Los equipos e instrumentos de laboratorio deben cubrir los requisitos para realizar las pruebas, validaciones y verificaciones (incluyendo la preparación de muestras, el procesamiento y análisis de pruebas o datos de calibración).

Además, es preciso verificarlos, calificarlos y calibrarlos regularmente siguiendo un programa. En el registro de mantenimiento debe asentarse el estado de calibración,

incluyendo la fecha en que fue realizada por última vez y la fecha de la próxima calibración.

Se deberá contar con Procedimientos Normalizados de Operación para utilizar y mantener los equipos de medición. El personal analítico debe tener al alcance las instrucciones de uso y mantenimiento de estos.

Se requiere la protección de la configuración del hardware y el software de los equipos utilizados en las pruebas, para que no se hagan ajustes que puedan invalidarlos.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA³³

Durante el desarrollo de un método analítico se hace uso de Sustancias de referencias, que están definidas como materiales altamente caracterizados que han demostrado tener las cualidades apropiadas que respaldan su uso previsto.^{28,30}

Se deben utilizar sustancias de referencia farmacopeicas siempre que estén disponibles y que sean apropiadas para el análisis. Cuando no se cuente con una sustancia de referencia farmacopeica, el fabricante puede establecer su propia sustancia de referencia, siempre que sea adecuadamente caracterizada.

Para mantener el rastreo de la información de los materiales ocupados durante el Ciclo de vida del método analítico, se debe identificar a las sustancias de referencia, este número debe asignarse a una hoja de trabajo analítico cada vez que se utilice la sustancia de referencia.

Asimismo, se debe mantener un registro de todas las sustancias de referencia, el cual debe ser permanente y contener la siguiente información:

- ✿ Número de identificación de la sustancia
- ✿ Descripción detallada de la sustancia
- ✿ Emisor o proveedor
- ✿ Fecha de recepción
- ✿ Lote
- ✿ Propósito de uso de la sustancia
- ✿ Datos sobre cualquier condición de almacenamiento
- ✿ Fecha de caducidad o fecha de reanálisis
- ✿ Certificado (declaración de validez del lote) de una sustancia de referencia y contenido asignado (cuando aplique), validez y vigencia

En el caso de las sustancias de referencia preparadas en el laboratorio, el expediente debe incluir los resultados de todas las pruebas y verificaciones usadas para establecerla como sustancia de referencia, así como fecha de caducidad o reanálisis.

Todas las sustancias de referencia preparadas en el laboratorio o suministradas externamente (no farmacopeicas), deben analizarse a intervalos regulares para demostrar que no existe deterioro y que las condiciones de almacenamiento son adecuadas para la sustancia o material.

REACTIVOS³³

Todos los reactivos químicos, incluyendo disolventes y materiales utilizados en los análisis, deben ser de la calidad y grado conveniente para su uso. Los reactivos se adquieren con proveedores aprobados y calificados, los cuales deben proporcionar un certificado de análisis y hoja de seguridad, cuando corresponda.

En la descripción del método se debe explicar el grado de cualquier reactivo crítico (inclusive el agua), junto con las precauciones de preparación, almacenaje y uso: toxicidad, inflamabilidad, estabilidad al calor, aire y luz, reacción con otras sustancias químicas y en ciertos contenedores y otros riesgos.

Los reactivos y otros materiales de referencia preparados en el laboratorio deben estar etiquetados para identificar la sustancia, su disolvente, cualquier precaución especial o riesgo, restricciones de uso, fecha de preparación y de caducidad y el responsable de prepararlos.

Las etiquetas de los reactivos deben especificar lo siguiente:

- ✱ Contenido
- ✱ Fabricante
- ✱ Fecha de recepción y apertura del contenedor
- ✱ Concentración, si corresponde
- ✱ Condiciones de almacenamiento
- ✱ Fecha de caducidad o reanálisis, si corresponde

Las etiquetas de las soluciones reactivo o preparadas en laboratorio deben especificar lo siguiente:

- ✱ Nombre
- ✱ Fecha de preparación
- ✱ Las iniciales del responsable de la preparación
- ✱ La fecha de caducidad o reanálisis, si corresponde

Los reactivos deben ser transportados en el envase original, cuando sea posible, y si tienen que fraccionarse, se deben etiquetar adecuadamente.

Previo al ejecutar un experimento de desarrollo, validación/verificación y/o transferencia de métodos, todos los contenedores de reactivos deben ser inspeccionados visualmente para verificar que se encuentran en buen estado, además, no se deben utilizar soluciones y reactivos deteriorados o caducos.

El agua se considera un reactivo. Se debe utilizar el grado apropiado para el análisis específico. Además, al ser un sistema crítico dentro de la Industria farmacéutica, se deben tomar las precauciones necesarias para que no se contamine durante el suministro, almacenamiento y distribución.

Los reactivos en reserva deben mantenerse en un almacén en condiciones apropiadas (temperatura ambiental, refrigeración o congelación según lo que indique el proveedor, protección de la luz y la solar, así como fuentes de calor).

ENTRENAMIENTO DEL PERSONAL ANALÍTICO²³

El laboratorio donde se efectúen experimentos de desarrollo, validación, verificación y transferencia de métodos analíticos debe tener personal con la escolaridad, experiencia, capacitación y conocimientos técnicos. Además, no deben tener conflictos de intereses ni estar sujetos a ninguna presión que interfiera con la confiabilidad de los ensayos.

Todo el personal involucrado debe recibir capacitación acerca de normas, objetivos, reglamentos internos, en aspectos técnicos, mediante cursos, seminarios, reuniones, talleres internos y externos.

El entrenamiento y calificación del personal analítico debe confirmarse mediante documentos en los que se demuestra la competencia del personal que operará equipos, instrumentos u otros dispositivos, así como las que realizarán análisis o calibraciones, validaciones o verificaciones.

El personal analítico debe contar con grado de licenciatura en Farmacia, Química analítica, Microbiología o carreras afines.

Debe conocer los procedimientos normalizados para llevar a cabo las operaciones analíticas, y en el caso de que se presenten desviaciones o no conformidades, deben ser documentadas y darles seguimiento.

CAPÍTULO 4. MÉTODOS ANALÍTICOS

CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS^{12,31,32}

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra.

El desarrollo de un método analítico se justifica por los siguientes aspectos:

- ✿ Moral y ética
- ✿ Aseguramiento de calidad
- ✿ Económica
- ✿ Regulatoria

Por ello, es necesario clasificar a los métodos analíticos para tener una gestión de conocimiento más amplia. Los métodos analíticos se clasifican de la siguiente manera:

✿ **En función de su estado regulatorio:**

- Métodos farmacopeicos
- Métodos no farmacopeicos

✿ **En función de su aplicación:**

- Métodos para producto a granel
- Métodos para producto terminado
- Métodos para muestra primaria
- Métodos indicativos de estabilidad

✿ **En función de la naturaleza de la respuesta analítica:**

- Métodos fisicoquímicos:

Cuando la respuesta es de carácter físico (absorción de luz, emisión de luz, voltaje, etc.) o químico (consumo de iones -OH, consumo de un acomplexante, etc.)

- **Métodos biológicos:**
Cuando la respuesta es de carácter biológico (crecimiento de microorganismos, protección, muerte, etc.)

Un método analítico puede estar constituido por técnicas de separación, extracción, etc., y por técnicas de medición como espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, etc., que permiten medir la respuesta analítica del analito en la muestra. En conjunto, se denomina Sistema de medición.

✿ **En función de la naturaleza del sistema de medición:**

- Métodos en los cuales el instrumento de medición de la respuesta analítica permite medir una señal de ruido, por ejemplo: cromatógrafo de líquidos, cromatógrafos de gases, espectrofotómetros, etc.
- Métodos en los cuales el instrumento de medición no permite medir una señal de ruido, por ejemplo: buretas, medidor de halos, potenciómetros, etc.).

✿ **En función de su propósito analítico:**

- Métodos para cuantificar un analito (contenido o potencia)
- Métodos para establecer la presencia de un analito a un límite
- Métodos para identificar un analito

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos en el Apéndice III. Validación de métodos analíticos. Recomendaciones para su presentación ante la FEUM, y la United States Pharmacopoeia en el capítulo <1225> clasifican a los métodos analíticos en cuatro categorías:

✿ **Categoría I.**

Métodos analíticos para la cuantificación de un componente en específico en muestras de producto terminado o en pruebas de estabilidad, ya sea en fármacos, aditivos, o preparados farmacéuticos, u otros analitos de interés (conservadores, solventes, etc.).

✿ **Categoría II.**

Métodos analíticos para la determinación de impurezas (productos de degradación, sustancias relacionadas, isómeros ópticos, etc.) en muestras de fármacos, preparados farmacéuticos y aditivos. Estos métodos pueden incluir determinaciones cuantitativas o pruebas límites. Los métodos de pureza quedan incluidos en esta categoría.

❁ **Categoría III.**

Métodos analíticos para la determinación de las características de desempeño; disolución, liberación de fármaco, entre otros.

❁ **Categoría IV.**

Pruebas de identificación de un analito en muestras de fármacos, aditivos o preparados farmacéuticos, cuyo propósito es establecer la presencia del analito de interés.

Esta clasificación se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar y/o evaluar en la validación del método analítico que se estudiarán más a detalle en los numerales *4.2 Protocolo de Validación* y *5.2 Etapa 2: Calificación del desempeño del procedimiento analítico*.

Se pueden presentar casos de métodos no clasificables en alguna de estas categorías, por lo que, el usuario debe establecer con claridad el propósito analítico.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

Una vez ejecutado el desarrollo del método analítico, se debe realizar la Calificación del desempeño del método o Validación del método analítico. La USP define a esta actividad como el proceso que establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.

Las características de desempeño analítico habituales que deben considerarse en la validación de métodos analíticos se encuentran descritos en la **Tabla II**, la cual es enunciativa, mas no limitativa.

Tabla II. Parámetros de desempeño utilizados en la Validación de métodos analíticos^{20,31,32}

Linealidad
Exactitud
Precisión
Especificidad
Límite de detección
Límite de cuantificación
Robustez
Tolerancia

Cada uno de los parámetros se describen a detalle en el numeral *5.2 Etapa 2: Calificación del desempeño de método*, sin embargo, es importante mencionarlos,

ya que, de acuerdo con la clasificación que se le asigne al método analítico en cuestión, serán los parámetros que se deben evaluar durante la calificación del desempeño del método.

La Guía de Validación de métodos analíticos del CNQFBM propone la evaluación de los parámetros de desempeño de acuerdo con la **Tabla III**, sin embargo, otras guías pueden considerar la evaluación de más o menos parámetros de desempeño (ver **Tabla II**):

Tabla III. Evaluación de parámetros de desempeño en un método analítico en función de su aplicabilidad analítica.¹²

Parámetro de desempeño	Contenido/ Potencia/ Valoración	Contenido/ Valoración	Límite	Identificación
Precisión/Adecuabilidad del sistema	Sí	Sí	Sí	*
Linealidad del sistema	Sí	Sí	No	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	Sí
Exactitud y Repetibilidad	Sí	Sí	No	No
Linealidad del método	Sí	Sí	No	No
Precisión del método o precisión intermedia	Sí	Sí	No	No
Estabilidad analítica de la muestra	*	Sí	No	No
Límite de detección	No	No	Sí	No
Límite de cuantificación	No	Sí	No	No
Robustez	*	*	*	No
Tolerancia	*	*	*	No

* Puede ser requerido dependiendo de la naturaleza del método.

En términos del estudio de laboratorio, los requisitos mínimos de características de desempeño deben documentarse en un protocolo, ejecutarse y, al término de éste, elaborar un informe donde se establezca su validez.

Un protocolo de Validación está definido como una descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

El protocolo de Validación debe especificar:

- ✿ Propósito
- ✿ Alcance
- ✿ Responsabilidades y competencias del equipo de trabajo

- ✿ Descripción del método analítico (Pasos no modificables durante la Validación)
 - ✿ Materiales y equipos
 - ✿ Parámetros de desempeño a evaluar y experimentación para evaluarlos
 - ✿ Análisis estadístico o ecuaciones para tratamiento de datos
 - ✿ Criterios de aceptación para cada parámetro de desempeño
- Los criterios de aceptación no pueden ser modificados durante la validación para ajustarse a los datos obtenidos.

Los puntos mencionados son enunciativos mas no limitativos, el contenido dependerá del Sistema de Gestión de Calidad de cada fabricante, sin embargo, la lista anterior enuncia la información mínima que debe contener un protocolo, además de que, éste debe ser realizado, revisado y aprobado previo a la Validación para así evitar modificaciones que afecten la integridad de datos de dicha actividad.

Para la ejecución de una Validación se deben considerar diversas actividades que den soporte a la confiabilidad de los resultados y/o datos arrojados después de todas las pruebas experimentales, tales como:

- ✿ Calibración y/o calificación de equipos vigente
- ✿ Calificación de personal
- ✿ Calificación de proveedores
- ✿ Inspecciones internas
- ✿ Monitoreos fisicoquímicos y/o microbiológicos
- ✿ Aplicación de Buenas Prácticas de Laboratorio
- ✿ Aplicación de Buenas Prácticas de Documentación

Aunque esta información da soporte a la ejecución de la Validación, no es obligatorio su inclusión dentro del Protocolo de Validación. ^{34,40}

CAPÍTULO 5. CICLO DE VIDA DEL MÉTODO ANALÍTICO

ETAPA 1: DISEÑO Y DESARROLLO DE MÉTODOS¹⁰

Cuando sea posible, antes de iniciar las actividades de diseño del procedimiento se debe establecer los ATP para los atributos de calidad que requieren análisis. Se puede seleccionar cualquier técnica que sea capaz de cumplir los criterios del ATP. Contar con conocimientos previos pertinentes proporciona una ayuda en las actividades de desarrollo del procedimiento, pudiendo incluir conocimientos sobre las propiedades físicas y químicas de los analitos, la información procedente de bibliografía científica y cualquier procedimiento existente para el análisis del mismo tipo de material o para atributos de materiales similares. También se puede considerar si existen tecnologías analíticas y/o procedimientos analíticos de plataforma pertinentes (aplicables a materiales de tipo similar) que puedan acelerar las actividades de desarrollo del procedimiento.

Una vez seleccionada la tecnología, y si se requiere desarrollar un nuevo procedimiento analítico, se debe recopilar información pertinente antes de llevar a cabo las actividades de desarrollo.

Dicha información puede incluir:

- ✿ Estructuras químicas conocidas y sus propiedades físicas y químicas
- ✿ Estándares de referencia, reactivos, posibles instrumentos y sistemas
- ✿ Cualquier otra información pertinente vinculada a los requisitos operativos, como por ejemplo el tipo/configuración de instrumentos y la preparación de la muestra.

Aplicación de los principios de AQbD

Los requisitos para un método analítico en particular están fuertemente ligados al producto y al atributo del producto al que se aplica el método. El resultado real

medido contendrá elementos de la variabilidad del método y del producto combinados a través de sus varianzas.

Es deseable reducir la variabilidad del método de modo que se convierta en una contribución relativamente pequeña a la variabilidad general. Además, el método puede sufrir otros errores como sesgos, interferencias, etc., que reducen la calidad de los datos. Los requisitos del método deben establecerse de manera que los datos generados por el método sean un buen reflejo del atributo del producto que se está probando y no estén enmascarados por errores analíticos.

Perfil Objetivo Analítico²³

La comprensión del producto y el proceso conduce a la identificación de atributos de calidad que requieren medición analítica para el control que se describen, por ejemplo, en un Perfil de Producto Objetivo de Calidad (QTPP).

Las características requeridas del método pueden definirse en un Perfil Objetivo Analítico (ATP), que puede verse como algo similar a una especificación para un análisis y análogo a un Perfil de producto objetivo de calidad. El ATP enumera características importantes del método (como: exactitud y precisión) y describe el grado en que estos deben ser controlados (por ejemplo, qué porcentaje de inexactitud o imprecisión es aceptable).

Una consideración importante es que, el ATP es independiente de la técnica analítica utilizada; simplemente define las características que debe tener el método para medir adecuadamente los atributos críticos de calidad (CQA) del producto.

Al determinar un ATP, se debe considerar lo siguiente:

- ⊗ Muestra a ensayar
- ⊗ Matriz en la que estará presente el analito
- ⊗ Rango de contenido de analito (o concentración si corresponde). Esto hace referencia al contenido en el producto (p. ej., sustancia farmacéutica, producto farmacéutico o excipiente), no a la cantidad de analito en la solución de muestra sujeta a la medición analítica)
- ⊗ Error permisible para la medición evaluado a través del sesgo y la precisión
- ⊗ Riesgo permitido de que no se cumplan los criterios (proporción de resultados que se espera que estén dentro de los criterios de aceptación)
- ⊗ Confianza en que se cumplen los criterios de riesgo e incertidumbre de medición

Algunos ejemplos de ATP son:

Ejemplo 1. Determinación cuantitativa de Polisacárido libre (FS) en una vacuna de glicoconjugado, que es un atributo importante para monitorear la reacción de conjugación, así como la pureza del glicoconjugado resultante.

Los requisitos de rendimiento establecidos se encuentran descritos en la **Tabla IV**.

Tabla IV. ATP para análisis de Polisacárido libre (no conjugado) en una vacuna.²³

Requisitos de rango de atributos		Especificidad	Precisión	
Criterio	Justificación	Criterio y justificación	Criterio	Justificación
De 4 a 1000 µg/mL	Debido a que la concentración total de polisacáridos (PS) está en el rango de 400 a 2000 µg/mL y el % de FS a cuantificar está en el rango de 1 a 50 % (el % de FS inferior al 1 % se considera no relevante para la perspectiva del producto)	Sin interferencias con polisacáridos conjugados, proteínas transportadoras y componentes tampón	≤10% en el rango de atributos	Con una probabilidad del 95 %, un valor individual se encontrará entre el 83 y el 121 % de su promedio a largo plazo (apropiado para monitorear la estabilidad)

Sobre la base de este ATP, se evaluaron diferentes tecnologías para determinar su idoneidad, incluida la Cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC PAD) y la Electroforesis capilar con detección UV (Cromatografía capilar electrocinética micelar, MEKC).

Gracias a los requisitos predefinidos establecidos en el ATP, y con base a la demostración experimental, se seleccionó MEKC-UV como la mejor opción, a pesar de que el conocimiento previo sobre las vacunas glicoconjugadas habría sugerido el uso de HPAEC-PAD. Los principales criterios de la selección fueron el potencial para mejorar la precisión y la especificidad, así como algunos criterios comerciales (por ejemplo, rendimiento).

Ejemplo 2. Se desarrolla un ensayo de Potencia e Impurezas para una forma de dosificación oral sólida. Se requiere extracción antes del análisis cromatográfico.

El compuesto es una molécula pequeña que es poco soluble y no muy estable en agua. Es altamente soluble en una variedad de solventes orgánicos y es más estable en solventes apróticos como el acetonitrilo. La formulación experimental consistía en pequeñas perlas de azúcar recubiertas con el fármaco activo y un polímero protector para evitar la degradación del fármaco en el estómago ácido. Posteriormente, estas perlas con cubierta entérica se introducen en una cápsula.

Los objetivos de extracción y las características de rendimiento deseadas se muestran en la **Tabla V**.

Inicialmente, se intentó desarrollar métodos manuales de preparación de muestras; sin embargo, se observó una degradación significativa al exponer el fármaco al agua

durante este procedimiento. El fármaco es relativamente estable en acetonitrilo, pero debido a que el recubrimiento polimérico protector no es soluble en acetonitrilo, colocar directamente las perlas intactas en este solvente no era una opción.

Tabla V. ATP para un método analítico de extracción.²³

Objetivos de extracción	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Extracción completa y reproducible del fármaco a partir de las cápsulas ✓ Degradación mínima durante el proceso de extracción ✓ Procedimiento seguro
Criterio de desempeño 1	Exactitud del método mejor que 2%
Criterio de desempeño 2	Precisión del método mejor que 2 %
Criterio de desempeño 3	Degradación durante la preparación de la muestra < 0.1 %
Criterio de desempeño 4	Exposición mínima entre el analista y el fármaco

Como alternativa, las perlas se molían manualmente hasta convertirlas en polvo, seguido de la extracción del fármaco del polvo usando acetonitrilo. Sin embargo, este procedimiento fue largo, irreproducible y planteó importantes problemas de seguridad en el manejo de este compuesto altamente potente. Por lo tanto, se requería un enfoque alternativo y se optó por la automatización, utilizando una estación de trabajo de procesamiento de tabletas II (TPWII).

Dado un ATP definido, el fabricante puede decidir cómo cumplir con los requisitos del ATP, es decir, qué tipo de método usar. Cuando varias técnicas ofrecen el rendimiento analítico requerido, los factores que no están relacionados con la calidad de los datos, como el costo, la velocidad y el impacto ambiental, se vuelven importantes.

El ATP se mantiene durante el ciclo de vida y también se puede utilizar como base para la gestión del ciclo de vida para garantizar que el procedimiento analítico siga siendo adecuado para el uso previsto.

Aplicación de los principios de Gestión de Riesgos^{10,23,26}

La guía ICH Q9 define un Riesgo como “La combinación de la probabilidad de que ocurra un daño y la gravedad del daño”. El riesgo puede significar muchas cosas diferentes en el contexto del desarrollo farmacéutico, pero desde el punto de vista de las agencias reguladoras, se trata principalmente del riesgo de daño para el paciente. En el contexto de las pruebas analíticas, se puede considerar el posible daño causado al paciente por un resultado analítico incorrecto que conduce a la liberación de un lote con características indeseables.

El proceso de Evaluación de riesgos o Gestión de Riesgo de la Calidad (QRM, por sus siglas en inglés) para los métodos analíticos es, por lo tanto, una determinación

(cualitativa o cuantitativa) de los efectos de la variación en factores como los parámetros operativos del método o las características de la muestra sobre el rendimiento del método. La evaluación del riesgo incluye la identificación de riesgos potenciales y el análisis de estos riesgos que conducen a una evaluación de la importancia de ese riesgo. El proceso de evaluación de riesgos brinda un beneficio importante para el desarrollo de métodos porque un buen análisis de cuáles son los parámetros verdaderamente importantes permite un estudio sistemático más centrado solo de esos parámetros durante todo el ciclo de vida del procedimiento analítico.

El objetivo de un proceso de QRM es evaluar las condiciones del procedimiento propuestas e identificar los controles apropiados para los parámetros del procedimiento analítico y los atributos de los materiales que garantizarán que el procedimiento cumple el ATP. Se deben considerar todas las variables asociadas con el procedimiento analítico, incluidas la preparación de la muestra y los estándares, los parámetros de los instrumentos y equipos, y las variables ambientales (p. ej., temperatura del laboratorio, humedad, etc.).

Las actividades de QRM se pueden llevar a cabo durante el desarrollo del procedimiento tanto formal como informalmente y las fuentes principales de sesgo y variabilidad se pueden identificar, reducir o incluso eliminar si se utilizan las tecnologías y las condiciones del procedimiento apropiadas.

El primer paso en el proceso de QRM es la evaluación de riesgos, que empieza con la identificación de estos. Existen diversas herramientas que ayudan a estructurar el proceso de evaluación de riesgos, por ejemplo:

- ⊗ Mapeo de procesos
- ⊗ Diagramas de Ishikawa o de espina de pescado

Tales herramientas cualitativas ayudan a definir los riesgos en un proceso o método al establecer sistemáticamente los diversos pasos del método e identificar los riesgos asociados. Por ejemplo, el proceso de análisis de un producto farmacéutico se puede mapear como si implicara una preparación de muestra automatizada seguida de un análisis cromatográfico.

Los diagramas de espina de pescado ilustran el proceso de forma diferente, se pueden identificar muchos factores de riesgo con cada proceso, pero al combinar el conocimiento analítico general de la técnica en uso y el conocimiento específico sobre el analito en particular, se pueden descartar rápidamente muchos riesgos hipotéticos, dejando relativamente pocos parámetros potencialmente críticos para el análisis de mayor consideración.

Contar con conocimientos previos relacionados con la tecnología analítica puede acelerar este paso. La **Figura VI** ilustra un intervalo de posibles variables asociadas a un método analítico por Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés).

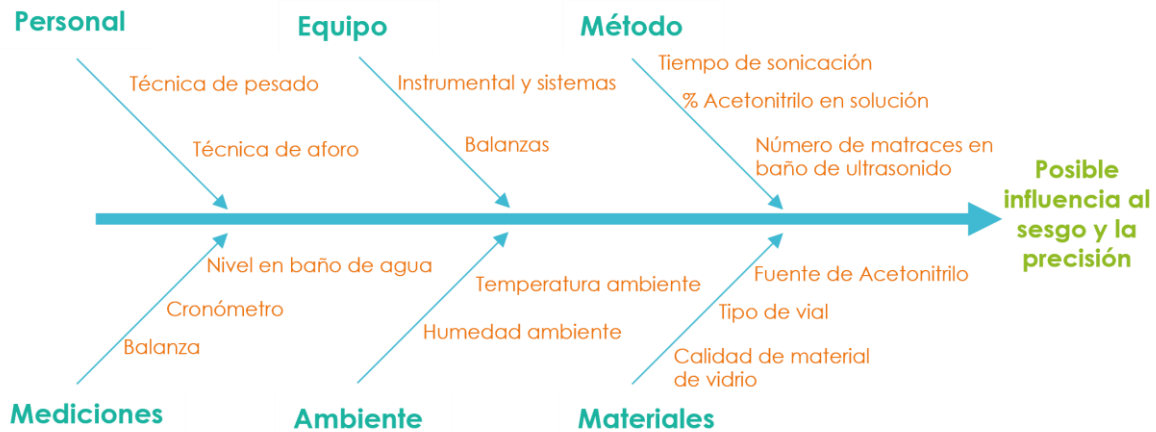


Figura VI. Diagrama de Ishikawa utilizado para identificar posibles variables en un método analítico.²³

Una vez identificadas las posibles variables, es posible estimar y clasificar el riesgo asociado con cada variable en función de su capacidad de cumplir el ATP y otros atributos de desempeño deseados. Esta evaluación se realiza a partir de conocimientos científicos previos, pero puede ser necesario considerar algunos factores de influencia desconocida como factores de mayor riesgo hasta que se disponga de más información.

Un *Mapa de calor* puede ser un método valioso para apoyar una evaluación cualitativa del riesgo. Un mapa de calor proporciona una indicación visual del grado de posible impacto (fuerte, medio, o menor) de las variables en el desempeño del procedimiento analítico (ver la **Tabla VI**).

De forma alternativa, se puede dar un valor y clasificar cada riesgo formalmente usando criterios de riesgo establecidos con herramientas, por ejemplo:

- ⊗ Clasificación relativa
- ⊗ Análisis de Efectos de modos de falla/Efectos de modo de falla y análisis de criticidad (FMEA/FMECA)

Las herramientas semicuantitativas para la clasificación de riesgos ayudan a definir qué elementos del método son realmente CQA.

Tabla VI. Ejemplo de un mapa de calor de una evaluación del riesgo de los pasos de preparación de una muestra y configuración de un HPLC de un método analítico.¹⁰

Operación analítica	Factor o variable analítica	Identificar riesgo potencial	Mapa de calor de riesgos*		Estrategia de control analítico
			Exactitud	Precisión	
Preparación de reactivos y muestras	Humedad del laboratorio	Absorción de vapor por la muestra puede llevar a pesada incorrecta o degradación.	Verde	Verde	Monitorear controles ambientales
	Habilidad analítica	Incorrecta preparación de la muestra, pesada o diluciones volumétricas.	Rojo	Amarillo	Programa y Documentación de capacitación
	Tiempo de ultrasonido	Disolución incompleta de la muestra.	Verde	Verde	Establecer límite o condiciones durante desarrollo
Configuración de instrumento y sistema	Lote de material de relleno de columna	Desempeño de la columna, forma de pico y tiempos de retención.	Rojo	Amarillo	Establecer variabilidad durante Etapa 1 y diseñar SST
	Calidad del disolvente	Deriva de línea base y ruido dependiendo de la longitud de onda pueden afectar la forma del pico.	Verde	Verde	Especificar grado y características de transmitancia requeridas
	Limpieza	Picos de inyecciones previas	Rojo	Amarillo	Establecer protocolos de limpieza, SST

*Niveles de impacto: Fuerte (rojo), medio (amarillo) y menor (verde).

Por ejemplo, después de la clasificación cualitativa inicial de los factores de riesgo, los parámetros restantes pueden evaluarse por su criticidad relativa; un factor que tiene el potencial de dar lugar a datos erróneos que no pueden identificarse fácilmente como erróneos se clasificaría como de alto riesgo, mientras que uno en el que el error se puede detectar fácilmente se clasificaría como de menor riesgo. FMEA evalúa los posibles modos de falla para cada paso en el método analítico y correlaciona cada modo de falla con un efecto probable ya sea para la seguridad del paciente o como un riesgo comercial. La causa raíz de cada modo de falla se postula con base en conocimientos previos o principios científicos generales. La evaluación puede extenderse para incluir una consideración de la criticidad de un riesgo particular y, por lo tanto, puede permitir la identificación de pasos del método donde las acciones preventivas adicionales pueden ser apropiadas para minimizar los riesgos.

Una vez determinado el riesgo asociado con cada factor y cada variable, se procede a planificar la gestión de estos riesgos. El riesgo de las variables que se conocen en profundidad se puede mitigar controlándolas dentro de un determinado intervalo

(variables de control). En el caso de otras variables será difícil o poco práctico controlarlas y será necesario aceptar los riesgos asociados (variables de ruido).

Algunas herramientas experimentales son:

- ⊗ Experimentos diseñados estadísticamente
- ⊗ Modelos mecanicistas

La experimentación es una forma directa de generar datos que se pueden usar para evaluar el impacto de los parámetros del procedimiento en el desempeño, y el uso de Diseño Estadístico de Experimentos (DOE, por sus siglas en inglés) es un modo efectivo de hacerlo. Este enfoque suele ser útil para explorar los parámetros del procedimiento y para optimizar las condiciones del procedimiento para obtener el desempeño deseado. En un experimento bien diseñado, la forma en la que se recopilan los datos garantiza que se estudian el efecto de las variables y sus posibles interacciones sobre los atributos de calidad.

Las herramientas estadísticas pueden apoyar y facilitar la evaluación de riesgos. Por ejemplo, un diseño factorial de detección puede demostrar la sensibilidad de un método a diferentes parámetros y la variabilidad encontrada dentro del espacio experimental. Los modelos mecánicos pueden proporcionar información similar. Un ejemplo simple sería la ecuación de Henderson - Hasselbach que relaciona el grado de ionización de un compuesto ($[base]/[ácido]$) con su pKa y el pH de la solución (**Ecuación 1**):

$$pH = pka + \log \frac{[base]}{[ácido]}$$

Ecuación 1. Ecuación de Henderson-Hasselbach.

Existe un axioma en cromatografía de líquidos en el que, para elegir el pH de una fase móvil, la fase móvil debe operar > 2 unidades de pH lejos del pKa del analito para que cambios menores en el pH no causen un gran cambio en la relación $[base]/[ácido]$, y, por ende, variación en la retención del analito. En la separación cromatográfica de impurezas donde se analizan simultáneamente especies con valores de pKa variables, la comprensión del estado de carga de cada componente ilustrará cuáles, si aplica, están potencialmente en riesgo de retención variable debido al cambio de pH y, por lo tanto, si el pH debe ser modificado y considerado un factor primario para futuras investigaciones.

Tener múltiples puntos de vista en la evaluación de riesgos reduce la posibilidad de que los riesgos potenciales se pasen por alto o se descarten (ejemplo, un analista

con base en la **Ecuación 1** puede considerar que los valores de pKa del analito están lejos del pH operativo, sin embargo, otro analista también considera que los valores de pKa de ácidos y bases débiles depende en gran medida de la mezcla de disolventes utilizada y evalúe si los valores "conocidos" son correctos en las condiciones cromatográficas utilizadas). La evaluación debe ser adecuadamente integral y no limitarse únicamente a las condiciones del método.

Proceso de diseño y desarrollo de métodos

Con muchas técnicas analíticas, se pueden lograr resultados útiles prácticamente sin desarrollo ni optimización de métodos. Por otro lado, hay muchos análisis en los que se deben ejecutar extensos experimentos de desarrollo y optimización, por ejemplo, análisis cromatográficos de impurezas, disolución o medidas del tamaño de partícula. Sin embargo, el ATP contiene una variedad de atributos de calidad, como exactitud y precisión, y requisitos en los que se requiere más experimentación para determinar las condiciones apropiadas en las que el ATP se cumple con una buena solidez del método. El objetivo de estos experimentos es comprender el efecto de los factores primarios previamente identificados que afectan el método.

Una herramienta útil en el desarrollo de métodos analíticos basados en AQBd es el uso de un modelo empírico basado en Diseño de Experimentos (DOE, por sus siglas en inglés) con base estadística. Un diseño de experimentos no solo proporciona un enfoque organizado para la resolución de problemas, sino que también permite una estimación eficiente y clara de los efectos que los factores tienen en las respuestas. Los factores (variables independientes) son elegidos y controlados por el desarrollador.

Los factores pueden ser cualitativos, como el tipo de columna o el solvente, que generalmente se denominan factores de "clase" y no están en una escala continua. O cuantitativos, como el tiempo o la velocidad, que se denominan factores "continuos". Cada factor se estudia en uno o más niveles. Una vez que se eligen los factores y los niveles, hay dos componentes principales en la construcción del diseño: (1) la combinación de los niveles de los factores que se incluirán en el diseño y (2) la cantidad de veces que se replicará cada combinación de los niveles de los factores.

Los usos de un diseño de experimentos en QbD generalmente son:

- ⊗ Estimar los efectos de los factores en las respuestas
- ⊗ Estudiar las interacciones entre los factores y sus efectos en las respuestas

- ✿ Estimar la precisión de una medida
- ✿ Identificar los factores que tienen un efecto significativo en las respuestas
- ✿ Seleccionar las condiciones y/o rangos óptimos de operación
- ✿ Identificar factores que tienen poco efecto en las respuestas (estudios de robustez)
- ✿ Identificar regiones de falla
- ✿ Reducir el número de factores (estudios de cribado)
- ✿ Reducir el número de niveles de factor
- ✿ Identificar rangos de factores
- ✿ Construir de modelos empíricos para predecir respuestas en el rango experimental (superficies de respuesta)
- ✿ Estimar coeficientes de modelos conocidos

Una estrategia general para aplicar un diseño de experimentos es realizar un diseño de detección (por ejemplo, Plackett/Burman) para reducir el número de niveles y/o factores, de modo que se pueda realizar un segundo estudio (por ejemplo, diseño factorial fraccional) para investigar más a fondo los factores más importantes. y evaluar las posibles interacciones entre los factores. El paso final es usar un diseño de superficie de respuesta para que se pueda ajustar un modelo empírico para establecer una relación entre cada respuesta y los factores. ^{10,23,31}

Diseños multifactoriales²³

Existen diversos tipos de diseños multifactoriales que podrían usarse en una estrategia de QbD, como diseños factoriales completos y fraccionales, anidados, parcelas divididas, mezclas y superficies de respuesta.

Un diseño comúnmente utilizado en la industria farmacéutica consta de un solo factor en varios niveles (OFAT, por sus siglas en inglés) que consiste en realizar un experimento unidireccional para un factor manteniendo constantes los otros factores, luego elegir otro factor manteniendo constantes los otros factores (incluido el primer factor). Por ejemplo, en un experimento cromatográfico, todos los ajustes pueden mantenerse constantes excepto el flujo. La tasa de flujo se puede establecer en valores específicos y se pueden realizar varias ejecuciones en cada una de estas configuraciones de tasa de flujo.

- Diseños factoriales

Los diseños factoriales son los diseños más comunes utilizados en QbD. Estos se utilizan para identificar factores importantes, así como cualquier interacción que pueda existir entre los factores. Estos diseños se utilizan para el desarrollo de

métodos, así como para mostrar la solidez de un método en una región. Consisten en dos o más factores con cada factor establecido en dos o más niveles.

Es importante ejecutar todos los experimentos en orden aleatorio para eliminar cualquier error sistemático.

- Diseños anidados

Estos se utilizan a menudo para dividir la variabilidad total del método en sus partes contribuyentes. Este tipo de diseño y análisis puede ayudar a identificar dónde se encuentran las mayores fuentes de variabilidad.

A menudo hay confusión sobre si un diseño es un diseño factorial o anidado. Por ejemplo, suponiendo que hay dos factores, "método" y "lote". Si solo hay tres lotes, A, B y C, y cada lote se prueba con ambos métodos, entonces el diseño es un diseño factorial. Sin embargo, si los lotes A, B, C probados por el método A son totalmente diferentes de los lotes D, E, F probados con el método B, entonces los lotes están anidados en el método. En el diseño anidado, hay seis lotes, pero en el diseño factorial, solo hay tres lotes.

- Superficie de respuesta

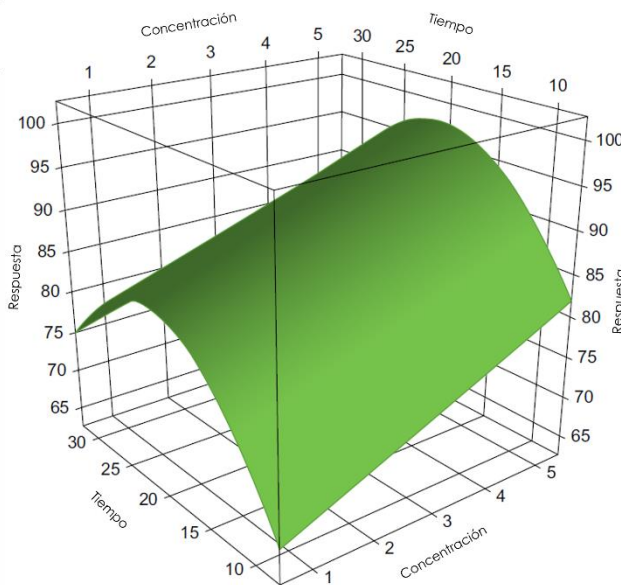


Figura VII. Ejemplo de diagrama de Superficie de respuesta para un diseño de experimentos de tres factores.

Las superficies de respuesta son muy útiles para determinar qué factores son importantes, cuál es el efecto de cambiar los niveles de los factores en la respuesta, estimar el error experimental y evaluar las interacciones entre los factores. Sin embargo, si solo se utilizan dos niveles para los factores cuantitativos, la interpolación o extrapolación puede ser muy arriesgada, ya que se debe suponer una relación lineal. Agregar puntos centrales puede permitir una estimación de la curvatura general, pero no puede identificar qué factor está causando la curvatura. Para interpolar o extrapolar, los diseños deben utilizar un número adecuado

de niveles para permitir una ecuación de predicción fiable (*Figura VII*).

Los diseños de superficie de respuesta se utilizan para desarrollar una función que relacionará las respuestas con los niveles de los factores. Los factores son generalmente cuantitativos.

- *Diseños de mezcla*

Los diseños de mezcla se utilizan cuando los niveles de los factores son proporciones de una cantidad total. Por ejemplo, una solución como una fase móvil o un solvente de extracción puede constar de tres componentes y cada componente representa un porcentaje del total; por ejemplo, 20 % del componente A, 30 % del componente B y 50 % del componente C. La suma de las proporciones es 100%. El objetivo del estudio puede ser encontrar la combinación óptima de porcentajes de factores.

Un ejemplo del diseño se puede ilustrar en la *Figura VIII*. Este diseño de mezcla particular se llama Red con cada componente que va de 0 a 1 por tercios.

Modelos mecanísticos

Es posible construir un modelo mecánico preciso, que describa el sistema que se está estudiando. En un estudio³⁵; autores encontraron que ambos enfoques podían describir su reacción. La construcción del modelo mecanicista tuvo la ventaja de desarrollar una mayor comprensión del proceso, una mayor capacidad para explorar condiciones transitorias y ayudó en la evaluación de riesgos por la capacidad de realizar simulaciones rápidamente para probar la sensibilidad de la reacción a varios factores. Por otro lado, el modelo empírico ofrece un enfoque en el que no se puede desarrollar un modelo mecanicista adecuado, debido a la complejidad del sistema. Por ejemplo, para aplicaciones analíticas, varios paquetes de software están disponibles para el desarrollo y optimización de métodos cromatográficos que se basan en modelos bien establecidos de retención cromatográfica. La retención cromatográfica se modela utilizando una variedad de expresiones que describen los efectos sobre la retención de parámetros como la composición de la fase móvil, la temperatura, el pH y la concentración de aditivos.

La retención en general se determina como una combinación de los efectos de los parámetros individuales. Los valores de los coeficientes se determinan en un pequeño número de experimentos; sin embargo, no es necesario estudiar todas las variables en cada caso, por ejemplo, si no hay aditivos o solutos ionizables, los efectos de pH y concentración de aditivos no se estudian. Por lo tanto, se puede obtener un modelo útil con un número muy limitado de experimentos. Además de la retención, se modelan el ancho y la forma de los picos y el resultado es un mapa de resolución que ilustra la resolución crítica entre los picos en función de parámetros

como el tiempo y la temperatura del análisis, para una combinación determinada de disolvente, dimensiones de la columna, flujo, etc.²³

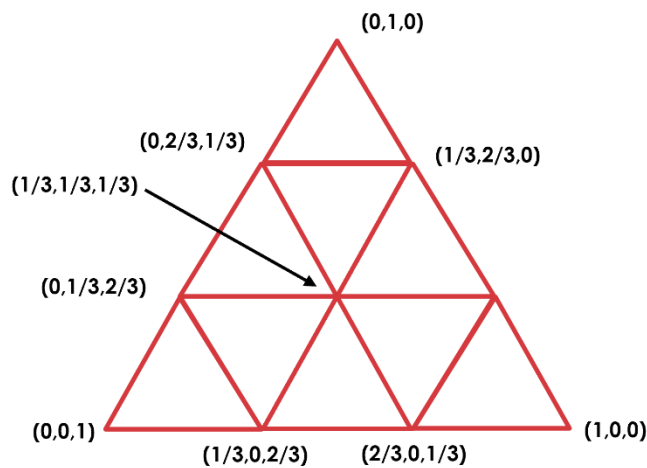


Figura VIII. Ejemplo de diagrama de Diseño de mezcla para tres factores.²³

En la **Figura IX-A** se muestra un ejemplo, que ilustra un mapa de resolución para una separación cromatográfica de líquidos de gradiente (la Resolución, R_s , es una medida de la separación de dos picos en un cromatograma basada en el ancho de los picos y su separación debe ser preferiblemente > 1.5). Los datos proceden de cuatro ejecuciones cromatográficas, a dos temperaturas y dos tiempos de gradiente.

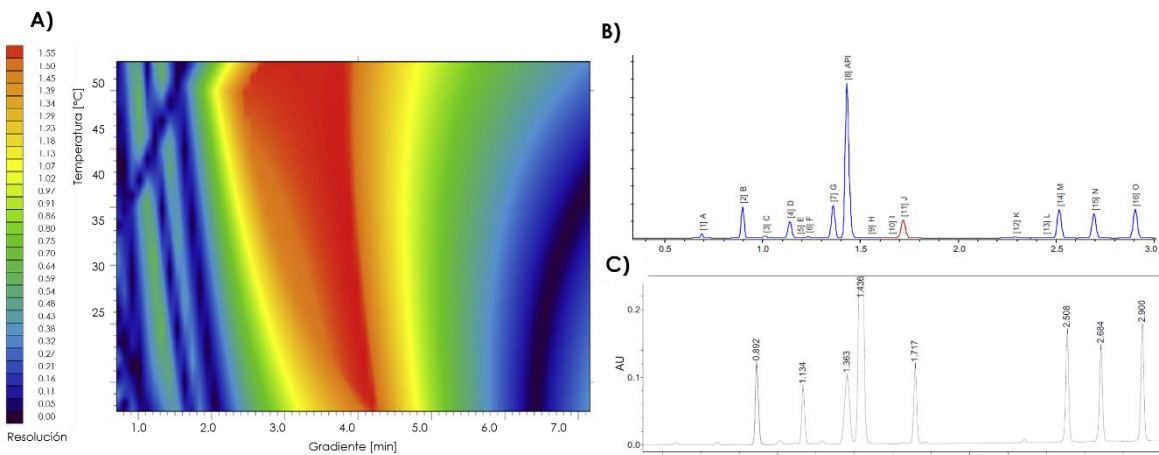


Figura IX. (A) Mapa de resolución generado con modelo mecanístico. (B) Cromatograma pronosticado. (C) Cromatograma observado.²³

En la superficie de respuesta (**Figura IX-A**), los colores más cálidos indican una mayor resolución entre un par de picos crítico, y se puede ver que existe una región óptima en la región central del mapa, con tiempos de gradiente de alrededor de 2.5 - 4 min y temperaturas en el intervalo de 40 °C a 50 °C.

Los cromatogramas pronosticados y reales se muestran en la **Figura IX-B** y **IX-C**, respectivamente, lo que ilustra el alto grado de precisión que se logra (los tiempos de retención pronosticados y reales concuerdan en 2 s en este ejemplo).²³

Robustez y tolerancia

La **Robustez** es una medida de la capacidad de un procedimiento de no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas en los parámetros y de mantener la aptitud durante condiciones normales de uso. En algunos casos, es útil demostrar la robustez del procedimiento desarrollando modelos que describan el efecto de los parámetros en el desempeño del procedimiento, ya sea evaluando el desempeño respecto al ATP o con otros criterios sustitutos. Esta información también permite determinar regiones de operación robusta para los parámetros del procedimiento y, si se desea, una Región de Diseño Operativo del Método (MODR, por sus siglas en inglés).¹⁰

La solidez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para cumplir con los requisitos de desempeño esperados durante el uso normal. La robustez se prueba mediante variaciones deliberadas de los parámetros del procedimiento analítico. El conocimiento previo y la evaluación de riesgos pueden informar la selección de parámetros para investigar durante el estudio de robustez. Deben estudiarse aquellos parámetros que puedan influir en el rendimiento del procedimiento durante el período previsto de uso.

La MODR es el espacio multivariante de los parámetros del procedimiento analítico que garantiza el cumplimiento con el ATP y, por lo tanto, proporciona una garantía de la calidad del valor medido. Si la MODR está relacionada con atributos vinculados a la eliminación del sesgo (como garantizar la separación apropiada en procedimientos cromatográficos) o la minimización de la variabilidad (mediante la operación a una longitud de onda adecuada de $\lambda_{\text{máx.}}$), no se espera que haya un impacto sobre el desempeño final del valor de informe. En consecuencia, no es necesario investigar por completo las características de desempeño de la validación dentro de la MODR. Cuando hay una serie de factores de ruido asociados con un procedimiento analítico, el desempeño puede variar con el tiempo entre laboratorios o instrumentos u otros factores de ruido. En tales casos, la MODR refleja la información en un momento dado y puede ser gestionada por el ciclo de vida analítico.¹⁰

Para la mayoría de los procedimientos, la evaluación de la robustez se lleva a cabo durante el desarrollo. Si la evaluación de robustez ya se realizó durante el desarrollo, no es necesario repetirla durante la validación. Para algunos procedimientos analíticos con una alta variabilidad de parámetros inherente (p. ej., aquellos que requieren reactivos biológicos), es posible que sea necesario investigar rangos más amplios durante los estudios de robustez. El resultado de la evaluación de la robustez debe reflejarse en la estrategia de control del procedimiento analítico.¹⁴

Rangos de parámetros de métodos analíticos (PAR)¹⁴

Los experimentos para investigar rangos de parámetros pueden proporcionar conocimientos adicionales sobre el rendimiento del procedimiento analítico.

Los rangos de los parámetros relevantes y sus interacciones se pueden investigar en un Diseño estadístico de experimentos, como los mencionados anteriormente. La evaluación de riesgos y el conocimiento previo deben usarse para identificar parámetros, atributos y rangos asociados apropiados para ser investigados experimentalmente. Las variables categóricas (p. ej., diferentes instrumentos) también se pueden considerar como parte del diseño experimental.

El resultado de los estudios de desarrollo puede proporcionar una comprensión de las relaciones entre las variables del procedimiento analítico (entradas) y las respuestas del procedimiento analítico (salidas). Según los resultados, se pueden definir puntos de ajuste fijos para algunos parámetros. Para otros, los PAR podrían definirse mientras que otros podrían incluirse en un MODR.

El fabricante puede proponer intervalos de parámetros (p. ej., PAR o MODR) en función de los datos de desarrollo y están sujetos a la aprobación regulatoria.

Por razones prácticas y siguiendo un enfoque basado en el riesgo, puede que no sea necesario o posible validar la totalidad de un MODR. La parte de un PAR o MODR prevista para uso rutinario en el procedimiento analítico debe estar cubierta por datos de validación.

ETAPA 2: CALIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL MÉTODO^{20,31,32}

Selectividad

La **Selectividad/Especificidad** del método permite investigar la influencia de otros componentes de la muestra en las determinaciones cualitativas o cuantitativas de un método analítico.

La FEUM la define como la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra, que pueden estar presentes (especificidad) o que se pudieran presentar por efectos ambientales y/o de interacción con los mismos componentes (selectividad) tales como: impurezas, productos de degradación o componentes de la misma muestra.

Determinación.

- ✿ Para el caso de especificidad se debe determinar, la respuesta a componentes como: aditivos, sustancias auxiliares, sustancias relacionadas estructuralmente al fármaco, etc.

- ✿ Para el caso de selectividad se debe determinar la respuesta a componentes como: sustancias de degradación del fármaco originadas por la influencia de las condiciones de almacenamiento temperatura, humedad, luz, etc.) o en condiciones extremas (hidrólisis, oxidación, etc.).

Linealidad

Cuando la relación entre la concentración y la respuesta del analito (o sus transformaciones matemáticas) no es lineal dentro del intervalo de trabajo, dará lugar a inexactitud del método analítico, por lo que, es conveniente verificarlo bajo las condiciones del laboratorio.

La **Linealidad** es la verificación de que la respuesta analítica y la concentración del analito se ajustan a un modelo matemático, en un intervalo de concentraciones pertinentes a la aplicación analítica. La linealidad se divide en dos: Linealidad del sistema, refiriéndose al uso de Sustancias de referencia. Y, Linealidad del método, haciendo referencia al uso de muestras o placebos adicionados del analito.

Determinación. Para la Linealidad del sistema, se debe investigar la relación concentración-respuesta en un intervalo que incluya al menos 5 niveles, por triplicado, de la concentración del analito. Este concepto generalmente se denomina "curva de calibración" y es parte esencial de varios métodos analíticos en las determinaciones cuantitativas del analito.

Para el estudio la linealidad del método, una muestra (placebo o muestra adicionados de analito) debe ser preparada al menos a tres niveles de concentración del analito por triplicado, para ser analizadas aplicando el método analítico.

Exactitud

La **Exactitud** de un método analítico está definida como la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra, a una cantidad fija.

Determinación. La exactitud, puede determinarse mediante placebos o muestras adicionadas preparados de manera independiente, al menos por sextuplicado, dichas muestras deben contener todos los componentes del producto y además se le debe adicionar la concentración del analito que represente el 100 %.

Precisión

5.2.4.1 Precisión del sistema

El sistema, analista, equipo e instrumentos de medición, soluciones de referencia, etc. originan una variabilidad inherente asociada a la respuesta analítica (absorbancia, transmitancia, mililitros consumidos, área del pico, altura del pico, área relativa, peso, entre otros), que en general es aditiva a la del método, por lo que, es importante verificar, que su valor no sea una fuente importante de la variabilidad.

La **Precisión del sistema** se define como el grado de concordancia relativa de la respuesta analítica de soluciones de referencia de concentración o magnitud conocida.

Determinación. A partir de una sustancia de referencia, el analista debe preparar por lo menos seis soluciones que representen al 100 % de la cantidad o concentración del analito en la muestra, ya sea, por dilución o por pesadas independientes y medir la respuesta dentro de una misma corrida analítica.

5.4.2.2 Precisión del método

Cuando un método analítico es exacto y lineal, la variabilidad de un resultado analítico se debe a factores aleatorios, como la incertidumbre de las mediciones debidas a: la balanza analítica, material graduado, material volumétrico, instrumento de medición de la respuesta analítica, corridas analíticas, analistas, laboratorios, lotes de reactivos, etc. Estos factores se pueden clasificar en factores aleatorios intramétodo, intralaboratorio e interlaboratorio. La precisión intramétodo se mide en términos de repetibilidad, la reproducibilidad intralaboratorio se mide en términos de la precisión intermedia, la reproducibilidad interlaboratorios se mide en términos de estudios colaborativos.

La **Precisión** de un método analítico es el grado de concordancia relativa entre los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, bajo las mismas condiciones analíticas (repetibilidad) o bajo diferentes condiciones analíticas (reproducibilidad), utilizando una muestra homogénea.

Repetibilidad

La **Repetibilidad** se refiere a la variación de los resultados de las muestras, al aplicar el método en una corrida analítica. La repetibilidad es una propiedad crítica

del método analítico porque mide la variación del método analítico en la rutina de trabajo.

Determinación. La repetibilidad se determina a partir de los resultados obtenidos de la exactitud (porcentaje de recobro) y de la linealidad del método (porcentaje de recobro) y de la relación de la concentración adicionada contra la concentración recuperada.

Reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia)

La **Precisión** intermedia expresa la variación dentro de un mismo laboratorio, cuando el método analítico se aplica en diferentes días y con diferentes analistas.

Determinación. La precisión intermedia se determina por el análisis de por lo menos tres alícuotas (muestras analíticas indicadas en el método), tomadas de una muestra homogénea; para ser analizadas en diferentes días (mínimo dos) y por diferentes analistas (mínimo dos).

Límite de detección

El **Límite de detección** (LD) es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.

Determinación para métodos no instrumentales. El límite de detección se puede determinar empleando el procedimiento de linealidad, en el cual es necesario generar una relación concentración vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá investigar linealidad, estimar la pendiente (b) y una medida del error de la respuesta analítica (Se).

Determinación para métodos instrumentales. El límite de detección se puede determinar empleando el procedimiento basado en "la señal-ruido" o el de linealidad. En el primero, se evalúa obteniendo las respuestas analíticas de muestras de concentraciones conocidas del analito y por el establecimiento de la respuesta analítica a una concentración cero del analito (blanco o matriz analítica sin analito) a la que comúnmente se la llama señal-ruido.

En el procedimiento de linealidad, es necesario generar una relación concentración vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá determinar la linealidad, estimar la pendiente (b) y una medida del error de la respuesta (Se).

Límite de cuantificación

El **Límite de cuantificación** (LC) se define como la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser determinada con exactitud y precisión aceptable.

Determinación para métodos no instrumentales. Es necesario generar una relación concentración adicionada vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá investigar la linealidad, estimar la pendiente (b) y una medida del error de la respuesta analítica (Se).

Determinación para métodos instrumentales. Se puede determinar empleando el procedimiento de la señal-ruido o de linealidad. En el primero, se evalúa obteniendo las respuestas analíticas de muestras de concentraciones conocidas del analito y por el establecimiento de la respuesta analítica a una concentración cero del analito (blanco o matriz analítica sin analito) a la que comúnmente se llama Señal-ruido.

En el procedimiento de Linealidad, es necesario generar una relación concentración vs respuesta analítica, con al menos tres niveles de concentración por triplicado, lo que permitirá determinar la linealidad, estimar la pendiente (b) y una medida del error de la respuesta (Se).

Pruebas de idoneidad del sistema

La Idoneidad del sistema (también llamada Verificación o Adecuabilidad del sistema) son pruebas utilizadas para verificar que el sistema funciona correctamente, con base en criterios establecidos previamente. Esta verificación permite establecer la confiabilidad del sistema, antes del procesamiento de las muestras durante el uso rutinario del método.

Si durante el desarrollo del método analítico se determina a través de la Robustez y Tolerancia que las mediciones son susceptibles a variaciones en las condiciones analíticas, éstas deben controlarse adecuadamente o debe incluirse una advertencia en el procedimiento. Bajo el mismo esquema de Robustez y Tolerancia, se debe establecer una serie de parámetros de aptitud del sistema para asegurar que la validez del procedimiento analítico se mantiene cada vez que se usa.

Algunas variaciones típicas son la estabilidad de soluciones analíticas, diferentes equipos y diferentes analistas. En Cromatografía de líquidos, las variaciones habituales son el pH de la fase móvil, la composición de la fase móvil, diferentes lotes o proveedores de columnas, temperatura y la velocidad de flujo. En el caso de

cromatografía de gases, son variaciones típicas los diferentes lotes o proveedores de columnas, la temperatura y la velocidad de flujo.^{20,36}

Determinación. En función del sistema de medición, se deben establecer las características relacionadas con su funcionamiento correcto, basadas en el tipo de equipo e instrumentación utilizado en el método. Éstas pueden ser definidas en función de una respuesta analítica, como pueden ser sus propiedades, su variabilidad, su forma, su tiempo de respuesta, indicadores de separación, indicadores de eficiencia, respuesta de blancos, entre otros.

Los criterios de aceptación deben basarse en los criterios de rendimiento del procedimiento analítico. Los componentes de la SST deben seleccionarse utilizando la evaluación de riesgos, así como el conocimiento y la comprensión de los datos de desarrollo.¹⁴

En la fase de desarrollo del método, las características mencionadas anteriormente y sus criterios de aceptación deben ser establecidas; durante la validación, la verificación y uso del método en análisis de rutina, deben ser verificados.

Requisitos de verificación y transferencia para métodos analíticos calificados

Verificación de métodos analíticos calificados^{21,34}

La **Verificación** de métodos analíticos calificados es la evaluación que sirve para determinar si el procedimiento puede ser utilizado para su propósito previsto, en las condiciones de uso reales para un fármaco específico y/o matriz de un producto farmacéutico determinado.

Si la verificación del procedimiento farmacopeico no es exitosa, se puede concluir que posiblemente el procedimiento no sea apto para usar con el artículo que se está evaluando en el laboratorio. Quizá se requiera desarrollar y validar un procedimiento alternativo.

Para verificar la aptitud de un procedimiento en las condiciones de uso reales no se requiere la revalidación completa del método farmacopeico, para el proceso de verificación se pueden usar algunas de las características de desempeño analítico que enlistan en la **Tabla II**, que se consideren adecuadas para la verificación del procedimiento específico.

El grado y la extensión del proceso de verificación puede depender del nivel de formación y experiencia del usuario, del tipo de procedimiento y los equipos o

instrumentos asociados, los pasos específicos del procedimiento y el artículo en análisis.

Los requisitos de verificación deben basarse en la evaluación de la complejidad tanto del procedimiento como del material al que se aplica el procedimiento. Se debe evaluar si el procedimiento farmacopeico es apto para el fármaco y/o la matriz del producto farmacéutico, teniendo en cuenta la ruta de síntesis del fármaco, el método de fabricación del producto farmacéutico, etcétera. Se deben considerar diversos elementos, tales como el efecto de la matriz sobre la recuperación de impurezas y fármacos desde la matriz de producto farmacéutico, la aptitud de las columnas y condiciones cromatográficas, y la adecuada respuesta de la señal del detector, entre otros. Un caso de estudio es, por ejemplo:

La evaluación de Especificidad es un parámetro clave en la verificación de que es apto para usar en la valoración de productos farmacéuticos.

Sugerencia de evaluación: Verificar la especificidad para un método cromatográfico con los requisitos de resolución de aptitud del sistema.

Criterio por considerar: Los excipientes en un producto farmacéutico pueden variar entre los fabricantes y tener el potencial para interferir en forma directa con el procedimiento o causar la formación de impurezas no consideradas en el procedimiento farmacopeico. Además, pueden afectar la recuperación del fármaco a partir de la matriz.

Solución al problema: Una evaluación más profunda de los efectos de la matriz para demostrar la aptitud del procedimiento en el producto farmacéutico específico como la evaluación de otras características de desempeño analítico como el límite de detección o cuantificación y precisión de procedimiento para impurezas.

Durante la verificación es obligatorio evaluar la estabilidad a largo plazo (más de 24 horas) y las condiciones de almacenamiento de las preparaciones Estándar y de la muestra durante todo el procedimiento.

No se requiere la verificación para los procedimientos de prueba farmacopeicos básicos que se lleven a cabo en forma rutinaria a menos que exista la indicación de que el procedimiento farmacopeico no es adecuado para el artículo en análisis. Los ejemplos de procedimientos farmacopeicos básicos incluyen, entre otros:

- ⊗ Pérdida por secado
- ⊗ Residuo de incineración

- ⊗ Índice de acidez
- ⊗ Mediciones de pH

Sin embargo, para la aplicación de procedimientos de rutina ya establecidos a artículos farmacopeicos que se analizan por primera vez, se recomienda que se consideren los requisitos nuevos o distintos para la manipulación de muestras o la preparación de soluciones.

Transferencia de métodos analíticos calificados^{14,41}

La **Transferencia de procedimientos analíticos**, también referida como **Transferencia de métodos**, es el proceso documentado que califica a un laboratorio (la unidad receptora) para emplear un procedimiento de prueba analítico que se originó en otro laboratorio (la unidad que transfiere), con lo que se asegura que la unidad receptora cuente con el conocimiento adecuado sobre el procedimiento y la capacidad para llevar a cabo el procedimiento analítico transferido según lo previsto.

Cuando resulte apropiado, y como parte de las actividades previas a la transferencia, la unidad que transfiere debe proporcionar capacitación a la unidad receptora; otra opción es que la unidad receptora lleve a cabo los procedimientos e identifique cualquier circunstancia que necesite ser resuelta antes de firmar el protocolo de transferencia. La capacitación debe ser documentada.

La unidad que transfiere, que se trata por lo general de la unidad de desarrollo, es responsable de proveer a la unidad receptora el procedimiento analítico, los estándares de referencia, los informes de validación, así como cualquier documentación necesaria, además de la capacitación y asistencia necesarias durante la transferencia. La unidad receptora puede ser una unidad de control de calidad, otra instalación dentro de la compañía u otra compañía, por ejemplo, una organización de investigación contratada.

La unidad receptora proporciona personal calificado o capacita adecuadamente al personal antes de la transferencia, asegura que las instalaciones y el instrumental estén adecuadamente calibrados y calificados según se requiera, y verifica que los sistemas del laboratorio cumplan con los reglamentos aplicables y con los procedimientos generales internos del laboratorio.

La unidad que transfiere y la unidad receptora deben comparar y discutir los datos obtenidos, así como cualquier desviación del protocolo. En esta discusión se debe tratar cualquier corrección o actualización realizada al informe final y al procedimiento analítico, necesaria para reproducir el procedimiento.

Se puede usar un solo lote del artículo para la transferencia, debido a que el objetivo de la transferencia no se relaciona con el proceso de fabricación, sino con la evaluación del desempeño del procedimiento analítico en la unidad receptora.

ETAPA 3: VERIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO DEL PROCEDIMIENTO PARA EL MANTENIMIENTO DEL ESTADO VALIDADO

La **Etapa 3** del ciclo de vida del método garantiza que el método analítico se mantiene controlado durante el uso de rutina y, por lo tanto, continúa cumpliendo los criterios definidos en el ATP.

Esta etapa incluye el monitoreo de rutina de los datos vinculados al desempeño del procedimiento analítico y la evaluación del desempeño del procedimiento después de realizar cambios para determinar si el procedimiento analítico sigue siendo apto para su propósito. Puesto que se puede realizar una gran cantidad de análisis a lo largo del tiempo durante la aplicación del procedimiento analítico, el monitoreo ofrece una oportunidad excelente para obtener datos de desempeño fiables durante la aplicación de rutina. A su vez, esto brinda la oportunidad de identificar comportamientos inusuales y una posible falta del desempeño esperado.^{10,14}

Para métodos analíticos de alto riesgo, el seguimiento de gráficos de control de los datos de rendimiento seleccionados, generados durante el uso rutinario del procedimiento, puede proporcionar una advertencia temprana de los cambios en el rendimiento. Estos datos pueden ser medidas directas de exactitud y precisión (p. ej., a través del análisis de una muestra de control de calidad) o medidas indirectas (p. ej., resolución cromatográfica entre picos, respuesta de señal a ruido, factor de cola de pico, etc.). Cuando el riesgo es bajo, la verificación del desempeño puede implicar simplemente el monitoreo de resultados atípicos y/o fallas de idoneidad del sistema.¹⁰

La verificación continua también puede actuar como medida preventiva al proporcionar una indicación temprana de posibles problemas de rendimiento o tendencias adversas y ayuda a identificar los cambios necesarios para el procedimiento analítico.

Requisitos para el control de rutina de los métodos analíticos

El monitoreo efectivo del método analítico proporciona la confianza continua de que los valores de informe generados son aptos para su propósito.

Esta etapa incluye un programa continuo para recolectar y analizar datos relacionados con el desempeño del procedimiento analítico. El monitoreo puede incluir el seguimiento de atributos de desempeño analítico como por ejemplo SST, incluyendo incumplimiento de las SST; tendencias de los datos de las corridas analíticas, incluyendo resultados fuera de especificación o fuera de tendencia por motivos analíticos; tendencias; y otros atributos según corresponda. El alcance del monitoreo debe estar basado en el riesgo asociado con el respectivo atributo de calidad y con el método analítico. Los datos y la información monitoreados se deben evaluar de forma periódica dependiendo del número de análisis realizados. Si hay una indicación de que el procedimiento no está controlado, es preciso llevar a cabo una investigación y tomar acciones correctivas y preventivas.¹⁰

Una estrategia de control de procedimientos analíticos debe garantizar que el procedimiento analítico funcione como se espera durante el uso de rutina a lo largo de su ciclo de vida y consta de un conjunto de controles, derivados de la comprensión actual del procedimiento analítico, incluidos los datos de desarrollo, la evaluación de riesgos y la solidez. El conocimiento previo también podría usarse para desarrollar la estrategia de control del procedimiento analítico.

La estrategia de control del procedimiento analítico debe definirse antes de la validación (ICH Q2) y debe confirmarse una vez finalizada la validación. La estrategia de control del procedimiento analítico incluye los parámetros del procedimiento analítico que necesitan control y la prueba de idoneidad del sistema (SST) que forma parte de la descripción del procedimiento analítico.

La validez de los resultados del procedimiento analítico depende del resultado de la SST. En el enfoque mejorado, un conjunto bien diseñado de parámetros y criterios de SST para garantizar el rendimiento del método podría representar un aspecto importante de la mitigación de riesgos.

Esto se denomina comúnmente control de calidad de datos. Se recomienda el monitoreo continuo de los resultados de los procedimientos analíticos seleccionados para buscar cualquier tendencia. La revisión de los resultados del procedimiento analítico facilita la gestión del ciclo de vida del procedimiento y permite una intervención proactiva para evitar fallas.¹⁴

Asimismo, el alcance del monitoreo de rutina requerido se puede definir utilizando un enfoque basado en el riesgo.³⁷ Es importante considerar qué medidas de rendimiento o riesgo del procedimiento analítico están fácilmente disponibles como entradas para una evaluación de riesgos. Dos enfoques de evaluación de riesgos son:

✿ Evaluación de riesgos sencilla

Este enfoque puede centrarse únicamente en el tipo y la complejidad del método analítico y su uso previsto. Este enfoque permite establecer una plataforma de evaluación de riesgos por tipo de procedimiento analítico (técnica). Se puede utilizar un factor de complejidad para garantizar que no se subestime ningún procedimiento inusualmente

complejo. Los procedimientos analíticos que no forman una parte crítica de la estrategia de control pueden ser tratados como de bajo riesgo por defecto.³⁸

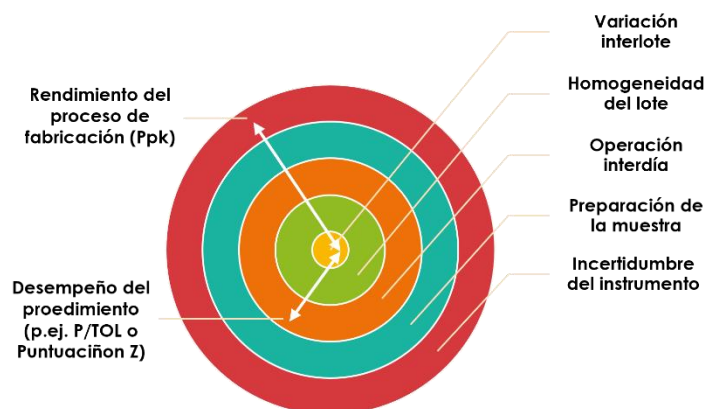


Figura X. Fuentes de variabilidad del producto y método analítico.³⁸

✿ Evaluación de riesgos basada en datos

Este enfoque puede incluir una evaluación del desempeño actual del proceso de fabricación (que incluye la variabilidad del producto y el procedimiento analítico) a través de una evaluación del desempeño del proceso (Ppk) y del procedimiento analítico si hay suficientes lotes representativos del proceso de fabricación.³⁸

Un enfoque de evaluación de riesgos más complicado puede incluir una evaluación de la capacidad (precisión) del método analítico específico en relación con la especificación del producto o ATP.

La relación precisión/tolerancia (P/TOL) y la puntuación Z son métricas que se pueden calcular para ayudar en dicha evaluación. También se pueden utilizar las tasas de conformidad y validez y/o la solidez y reproducibilidad del método. Cuando se haya demostrado que los métodos son sensibles a los cambios (p. ej., analista, equipo, entorno, lotes de reactivos o pequeños cambios en los parámetros del procedimiento), esta sensibilidad presenta un mayor riesgo. La **Figura X** muestra las fuentes de variabilidad asociadas con Ppk y las métricas de capacidad del procedimiento (como P/TOL y Valor Z).³⁷

✿ Evaluación del desempeño del proceso de manufactura a través de Ppk

Ppk es un índice de rendimiento del proceso y se puede utilizar como una medida sustituta en el peor de los casos para la precisión del procedimiento analítico. Representa una combinación del proceso de fabricación y la variabilidad del procedimiento analítico a largo plazo. Si un producto farmacéutico tiene una buena capacidad de proceso general (Ppk) para un atributo de calidad particular, entonces se puede suponer que la precisión del procedimiento analítico es buena (ver **Ecuación II**).³⁸

$$Ppk = \min \left\{ \frac{USL - \mu}{3\sigma_{general}}, \frac{\mu - LSL}{3\sigma_{general}} \right\}$$

Ecuación II. Cálculo de Índice Ppk para procesos de manufactura.

Donde USL es el límite de especificación superior, LSL es el límite de especificación inferior, μ es la media del proceso y $\sigma_{general}$ es la desviación estándar combinada del proceso y el procedimiento analítico.

✿ Evaluación del desempeño de procedimientos analíticos a través de P/TOL o Z-Score

P/TOL se define como se muestra en la **Ecuación III**³⁹:

$$\frac{P}{TOL_{1-lado}} = \text{mínimo de } \frac{3\sigma_a}{(USL - \text{media del proceso})}$$

$$\frac{P}{TOL_{1-lado}} = \text{mínimo de } \frac{3\sigma_a}{(\text{media del proceso} - LSL)}$$

Ecuación III. Cálculo de valor P/TOL.

donde σ_a es la desviación estándar del procedimiento analítico. Son deseables valores bajos de P/TOL.

El puntaje Z es similar a P/TOL, ya que se define como el número de desviaciones estándar del procedimiento analítico entre la media del proceso y el límite de especificación más cercano (consulte la **Ecuación IV**):

$$Z = \frac{|(SL - \mu)|}{\sigma_a}$$

Ecuación IV. Cálculo de Valor Z.

donde SL es el límite de especificación más cercano a la media del proceso (μ). Son deseables puntuaciones Z altas.³⁹

Análisis de tendencia utilizando herramientas estadísticas de control de procesos

Los estudios de estabilidad de medicamentos son la evidencia científica que demuestran el periodo de vida útil asignado a éstos. Dichos estudios, permiten asignar/confirmar los periodos de caducidad/reanálisis, así como para evaluar cómo cambia la calidad de los medicamentos con el tiempo, en diferentes condiciones de almacenamiento y transporte.¹³ Sin embargo, en la actualidad, la importancia de realizar análisis de tendencias en los estudios de estabilidad de medicamentos está tomando cada vez más relevancia, sobre todo para las agencias regulatorias.

Los análisis de tendencias son herramientas estadísticas que permiten analizar los datos recopilados durante los estudios de estabilidad de los medicamentos para detectar patrones y tendencias en los resultados. Estos patrones y tendencias pueden proporcionar información valiosa sobre la estabilidad del medicamento, su formulación y envasado, y pueden ayudar a los fabricantes a tomar decisiones informadas sobre la calidad del producto. Y bajo el concepto de Calidad por Diseño (QbD), la Revisión Anual de Producto (RAP) y el análisis de tendencias también puede dar soporte a la verificación continua del desempeño de métodos analíticos para el Mantenimiento del estado validado.

El uso de diagramas de control es una práctica recomendada para monitorear los atributos de desempeño del método y los resultados de las muestras de control. Un **Diagrama de control** o **Carta control** es una gráfica de una variable de respuesta en el tiempo con límites basados en la distribución de valores esperados alrededor del valor medio o blanco (ver la **Figura XI**). Este enfoque está basado en la premisa de que, independientemente de lo bien diseñado que esté un procedimiento, existe una cierta cantidad de variabilidad natural en las mediciones. Cuando una variación es debida solo a causas aleatorias, se dice que el procedimiento está estadísticamente controlado

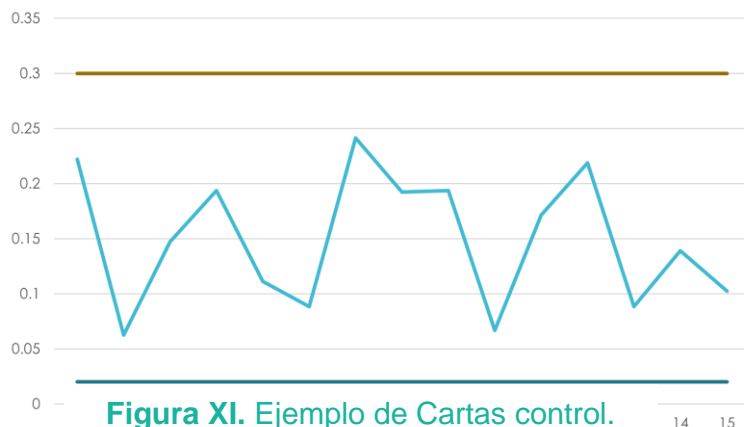


Figura XI. Ejemplo de Cartas control.

14 15

y, por lo general, los valores del diagrama deberían permanecer dentro de los límites del diagrama de control.

Los límites del diagrama de control se pueden establecer de forma que detecten la presencia de causas especiales de variación, cambios súbitos del proceso, derivas a largo plazo, o ruido excesivo. Cuando se detecta una variación de causa especial, se puede llevar a cabo una investigación para determinar la causa raíz y las acciones correctivas apropiadas. ^{10,38}

Para la construcción de Diagramas de control y obtener una mejor interpretación se pueden utilizar los siguientes parámetros estadísticos:

- ✱ Promedio
- ✱ Desviación estándar
- ✱ Desviación estándar relativa
- ✱ Valor mínimo
- ✱ Valor máximo
- ✱ Cp
- ✱ Cpk
- ✱ Fracción disconforme
- ✱ Frecuencia de disconformidad
- ✱ Curtosis estandarizada
- ✱ Sesgo estandarizado

La lista anterior es enunciativa, más no limitativa. El fabricante debe establecer la exigencia o rigurosidad del análisis de los datos recabados.

El monitoreo de los atributos del control analítico a lo largo del tiempo proporciona datos que se pueden usar para comprender mejor la variación real de los componentes del procedimiento y la variación general del mismo. Esta comprensión puede ser valiosa para determinar mejoras necesarias del procedimiento y para mejorar la ACS.

La ACS se puede usar como fuente para identificar los atributos pertinentes que se usarán en el monitoreo permanente, por ejemplo, atributos de las SST tales como la precisión del sistema, la relación señal-ruido, o la simetría de picos. Los atributos operacionales que no están directamente vinculados al ATP pueden no ser lo suficientemente adecuados para el programa de monitoreo del desempeño. No obstante, el monitoreo de tales atributos, p. ej., la resolución del pico o la simetría del pico en HPLC puede aun así ofrecer beneficios para determinar de forma

proactiva las actividades requeridas, tales como una sustitución de la columna de HPLC.

El fabricante puede establecer desde la ACS cuáles serán los parámetros que serán evaluados en la Etapa 3 del Ciclo de vida del método analítico y cuáles serán los criterios de aceptación y/o especificaciones.^{10,14}

Control de desviación y control de cambios^{3,4,10,14,27}

Desviaciones

Una **Desviación** o **No conformidad** se define como el no cumplimiento de un requisito previamente establecido.

Cuando ocurra una No conformidad, el fabricante debe:

- ✿ Reaccionar ante la No conformidad y, cuando sea aplicable:
 - Tomar acciones para controlarla y corregirla;
 - Hacer frente a las consecuencias
- ✿ Evaluar la necesidad de acciones para eliminar las causas de la no conformidad, con el fin de que no vuelva a ocurrir ni ocurra en otra parte, mediante:
 1. La revisión y el análisis de la no conformidad
 2. La determinación de las causas de la no conformidad
 3. La determinación de si existen no conformidades similares, o que potencialmente puedan ocurrir
- ✿ Implementar cualquier acción necesaria
- ✿ Revisar la eficacia de cualquier acción correctiva tomada
- ✿ Si fuera necesario, actualizar los riesgos y oportunidades determinados durante la planificación; y
- ✿ Si fuera necesario, hacer cambios al sistema de Gestión de la calidad

- CAPA (Acciones preventivas, acciones correctivas)

Debe existir un sistema para la implementación de las CAPA resultantes de las no conformidades, quejas, devoluciones, fuera de especificaciones, auditorías, tendencias, y las que defina el propio sistema.

Debe ser establecida una metodología para la investigación de desviaciones o no conformidades que incluya el uso de herramientas técnicas y/o estadísticas para determinar la causa raíz, la definición de responsables y las fechas compromiso y dar seguimiento a las CAPA implementadas para verificar su efectividad.

Las acciones correctivas deben ser apropiadas a los efectos de las no conformidades encontradas.

El fabricante debe conservar información documentada como evidencia de:

- ✿ La naturaleza de las no conformidades y cualquier acción tomada posteriormente;
- ✿ Los resultados de cualquier acción correctiva.

Control de cambios

La innovación, la mejora continua, los resultados del rendimiento de procesos y el control de la calidad de un producto impulsan el cambio.

A lo largo del ciclo de vida puede ser necesario tener que realizar cambios a los procedimientos analíticos, necesidad que puede surgir debido a diversos eventos incluyendo cambios necesarios identificados mediante un programa de monitoreo de rutina, la adopción de una nueva tecnología, o los cambios en el ATP. Estos cambios deben ser evaluados con respecto al riesgo de su impacto para determinar las actividades apropiadas requeridas. Asimismo, cuando se hagan cambios a un procedimiento, se deben usar enfoques de gestión de cambios y documentación apropiados.

Dependiendo del nivel de cambio realizado al procedimiento analítico, variarán las acciones requeridas para confirmar el desempeño después del cambio. El nivel de actividades requerido para confirmar que un procedimiento analítico modificado produce datos aptos para su propósito dependerá de una evaluación del riesgo asociado con el cambio, el conocimiento disponible sobre el procedimiento, y la eficacia de la ACS.

El **Control de cambios** se define como la evaluación y documentación de cualquier cambio que pudiera impactar en la calidad del producto.

El sistema de gestión de cambios garantiza que la mejora continua se lleve a cabo de manera oportuna y eficaz. Debe proporcionar un alto grado de seguridad de que no hay consecuencias no deseadas del cambio.

Debe existir un sistema documentado de control de cambios que incluya la gestión de riesgos para la evaluación e impacto del cambio propuesto sobre métodos analíticos, especificaciones y calidad del producto.

Los cambios no planeados deben considerarse como desviaciones o no conformidades.

El sistema de gestión de cambios debe incluir lo siguiente, según corresponda para la etapa del ciclo de vida:

- ✿ La gestión de riesgos de calidad debe utilizarse para evaluar los cambios propuestos.
- ✿ Los cambios propuestos deben evaluarse en relación con la autorización de comercialización, incluido el espacio de diseño, cuando se haya establecido, y/o la comprensión actual del producto y el proceso. Como se indica en la guía ICH Q8, trabajar dentro del espacio de diseño no se considera un cambio. Sin embargo, desde el punto de vista del sistema de calidad farmacéutica, todos los cambios deben ser evaluados por el sistema de gestión de cambios del fabricante.
- ✿ Los cambios propuestos deben ser evaluados por equipos de expertos que contribuyan con la experiencia y los conocimientos apropiados de áreas relevantes (desarrollo farmacéutico, fabricación, calidad, asuntos regulatorios y medicina), para garantizar que el cambio esté técnicamente justificado.

Algunos cambios pueden ser:

- ✿ Un cambio a un nuevo laboratorio (es decir, transferencia analítica) requerirá revisar la evaluación de riesgo y las actividades de calificación apropiadas para garantizar que el procedimiento implementado cumple los requisitos del ATP.
- ✿ Un cambio a un nuevo procedimiento o técnica requerirá actividades de calificación y de diseño apropiadas nuevas o adicionales (Etapa 1 y Etapa 2) para demostrar que el nuevo procedimiento cumple los criterios del ATP.

CAPÍTULO 6. APLICACIÓN DE AQbD EN CASO DE ESTUDIO

CASO DE ESTUDIO

El caso de estudio se centra llevar a cabo el desarrollo de un método analítico para la prueba de Disolución en un producto que contiene Furosemida/Espironolactona 20 mg/50 mg en cápsulas.

Generación de conocimiento y Perfil Analítico Objetivo

Actualmente se comercializa el medicamento con Furosemida 20 mg y Espironolactona 50 mg en cápsulas bajo el nombre de Lasilacton cuyo fabricante es Sanofi Aventis de México S.A de C.V. y está clasificado como Medicamento de referencia de acuerdo con el Listado de Medicamentos de Referencia emitido en febrero de 2023.⁴² Sin embargo, en búsqueda bibliográfica, se encontró que la patente aún está vigente, por lo que, la información técnico-científica relacionada a la combinación de los principios activos es limitada.

Asimismo, hay una variedad de medicamentos que contienen estos principios activos solos o en combinación con otros fármacos y en forma farmacéutica de tabletas.

Actualmente, se sabe que Furosemida es un derivado del ácido antranílico y pertenece al grupo de los diuréticos que actúan sobre el asa de Henle.⁴³ Y, Espironolactona se encuentra indicada en el tratamiento de la hipertensión esencial y el edema asociado con la insuficiencia cardíaca congestiva, el síndrome nefrótico y edema idiopático y en el diagnóstico del aldosteronismo primario.⁴⁴

Las propiedades fisicoquímicas de Furosemida y Espironolactona (ver **figuras XII y XIII**) se encuentran resumidas en la **Tabla VII**:

Tabla VII. Propiedades fisicoquímicas de Furosemida y Espironolactona.^{43,44,45}

Propiedad/Característica	Furosemida	Espironolactona
Peso molecular	330.745 g mol ⁻¹	416.57 g mol ⁻¹
Fórmula condensada	C ₁₂ H ₁₁ ClN ₂ O ₅ S	C ₂₄ H ₃₄ O ₄ S
pKa	pKa 1 = 3.8 pKa 2 = 7.5	Molécula neutra
Apariencia	Polvo cristalino blanco e inodoro	Polvo blanquecino a ligeramente amarillo
Solubilidad	Escasamente soluble en alcohol y soluble en soluciones básicas diluidas.	Soluble en etanol (96 %) e insoluble en agua
Grupos funcionales	Amida, sulfonamida, halogenuro, lactona, ácido carboxílico, amina secundaria	Lactona, tioacetilo

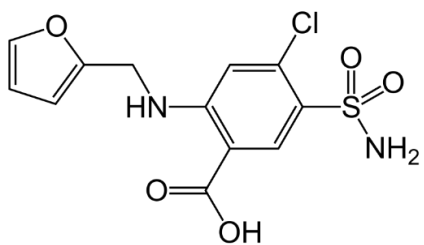


Figura XII. Estructura química de Furosemida.⁴⁴

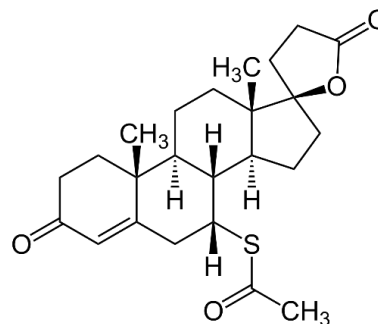


Figura XIII. Estructura química de Espironolactona.⁴⁵

Clasificación del método analítico y Validación

Para establecer la ejecución de la Etapa 2 del método analítico, es importante conocer la naturaleza y aplicación de este. A partir de esta información, se puede generar una estrategia más confiable para la calificación de desempeño del método analítico y cumpla con los requisitos del ATP.

El caso de estudio implica el desarrollo de un método para la prueba de Disolución. De acuerdo con el Apéndice III de la Farmacopea mexicana, el método a desarrollar se clasifica en la Categoría III; métodos analíticos para la determinación de desempeño de un producto.³¹

Con base en la clasificación, la guía ICH Q2A y el apéndice III de la Farmacopea mexicana, se estableció que los parámetros de desempeño a evaluar durante la Validación del método son: Linealidad (sistema y método), Exactitud, Precisión (sistema y método), Especificidad/Selectividad, Robustez y Tolerancia. Todos los parámetros, a excepción de Precisión de método, están indicados como sugerencia dependiendo la naturaleza del método.

Límite de detección y cuantificación también se sugiere su evaluación durante la Validación, sin embargo, por las dosis de los principios activos en el producto y la aplicación del método (liberación de producto), se opta por no realizar su evaluación.

Gestión de riesgos

Para poder llevar a cabo el desarrollo del método analítico, es preciso identificar los posibles riesgos que puedan surgir durante el mismo desarrollo o posterior a éste. Los riesgos se identifican con un diagrama de causa-raíz, como el siguiente, el cual es enunciativo, más no limitativo:

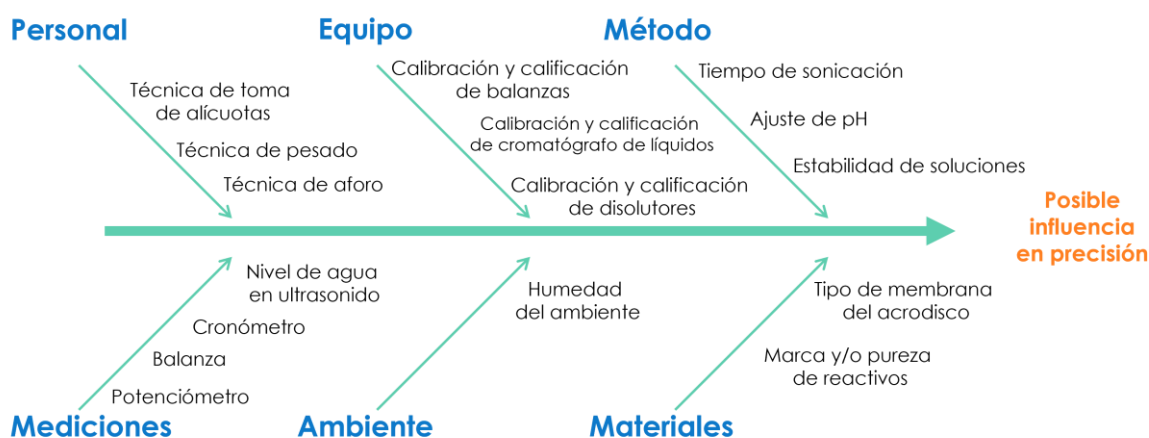


Figura XIV. Identificación de riesgos en el método analítico de Disolución de Furosemida/Espironolactona en un diagrama Causa-raíz.

Si bien, además de identificar los riesgos, se debe realizar una evaluación de la severidad, frecuencia y probabilidad de cada riesgo con otro tipo de herramientas y con base en esto, concluir si se mitigan los riesgos o se asumen y teniéndolos en control, siempre considerando el impacto a la eficacia, seguridad y calidad del producto farmacéutico.

Bajo este esquema, los riesgos que se encontraron como críticos en la gestión de riesgos y en durante el desarrollo del método y que, bajo ciertos controles se monitorearán, son:

- ✿ Técnica de aforo en Soluciones de referencia debido a la presencia de espuma generada por Lauril sulfato de sodio en el medio de disolución.
- ✿ Técnica de aforo en preparación del medio de disolución por la espuma generada por Lauril sulfato de sodio.
- ✿ Técnica de trasvase de medio de disolución a vasos disolutores.
- ✿ Técnica de toma de alícuotas por espuma generada por Lauril sulfato de sodio en el medio de disolución.
- ✿ Tiempo de sonicación de Sustancias de referencia en preparación de Soluciones de referencia.
- ✿ Volumen de descarte en Soluciones de referencia y muestra a través del acrodisco al vial cromatográfico.
- ✿ Marca de ácido fosfórico.

La capacitación y calificación del personal, el programa de verificación de material volumétrico, mantenimiento de parrillas de agitación y calentamiento y baño de ultrasonido; son algunos criterios que permiten controlar los riesgos identificados.

Proceso de diseño del método

Estudios han demostrado un extenso metabolismo de Espironolactona a partir de su administración al paciente. El metabolito principal es la Canrenona, se ha demostrado que alrededor del 79 % de la dosis oral inicial de Espironolactona se convierte en Canrenona.⁴⁶ La reacción química de Espironolactona a Canrenona se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa ocurre una hidrólisis rápida del sustituyente 7α -tioacetilo (**Figura XV-A**) en pH básico dando como resultado la formación del sustituyente 7α -tiol (**Figura XV-B**). La segunda etapa sigue una eliminación mucho más lenta de sulfuro de hidrógeno al resto de la 4,6-dienona (**Figura XV-C**).⁴⁷ Por lo tanto, no se produce una destioacetilación directa en este sistema, lo que sugiere la formación metabólica intermedia del 7α -tiol *in vivo*, como se muestra en la **Figura XV**:

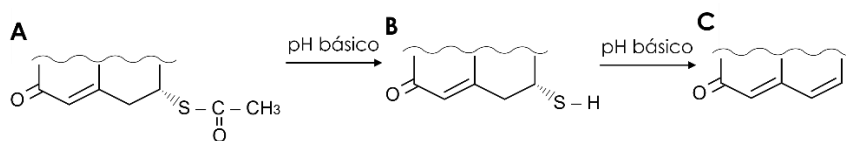


Figura XV. Metabolismo de Espironolactona a sus principales metabolitos. **(A)** Estructura de Espironolactona. **(B)** Estructura química de 7α -tioespironolactona. **(C)** Estructura química Canrenona.⁴⁶

Asimismo, se ha reportado que los valores de $T_{\text{máx}}$ de Espironolactona y Canrenona son de aproximadamente 2.6 h y 4.3 h, respectivamente.⁴⁶

Inicialmente se propondría utilizar un medio de disolución con pH ácido justificado con la $T_{\text{máx}}$ de Espironolactona, el cual indica que la absorción se lleva a cabo en el estómago. Sin embargo, por el tiempo en el que se lleva a cabo la metabolización de Espironolactona a Canrenona (*Figura XV*), el pH básico y el alto % que se obtiene de Canrenona durante el metabolismo de Espironolactona, es más factible proponer un medio más básico y que sea cercano al pH fisiológico del intestino delgado, por ejemplo: Buffer de acetatos pH 4.5, buffer de fosfatos pH 5.8 y/o buffer de fosfatos pH 6.8.

La Furosemida se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. El efecto diurético de Furosemida es evidente dentro de la hora siguiente a la administración oral y el efecto máximo se produce en la primera o segunda hora.⁴⁸

Teniendo los datos de concentración plasmática máxima de ambos principios activos cercanos a 1 h, aproximadamente, se propone que la evaluación de la prueba de Disolución sea de al menos 60 minutos.

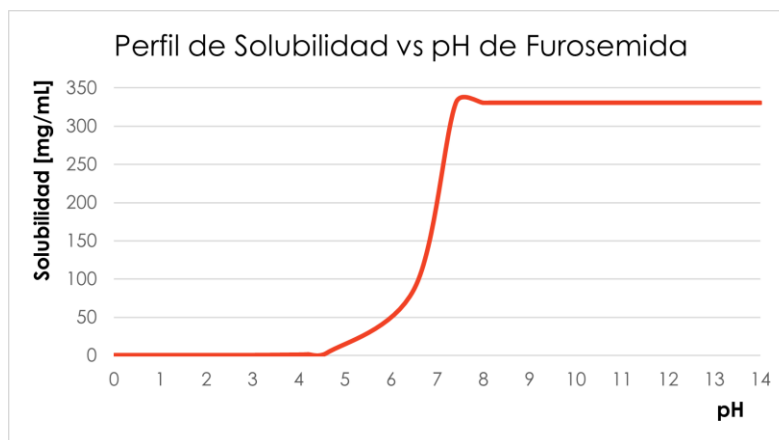


Figura XVI. Perfil de Solubilidad vs pH de Furosemida.

La Furosemida tiene una solubilidad de 0.0731 mg/mL (a 30 °C)⁴⁴, mientras que para la Espironolactona la solubilidad es de 0.00198 mg/mL⁴⁵. De acuerdo con la *Figura XVI*, la solubilidad de Furosemida aumenta considerablemente conforme el pH es más básico, encontrándose el valor más alto en pH 6.8, asimismo, en la *Figura XVII* se muestra que en un intervalo de pH de 6 a 8, se encuentra una estabilidad cercana al 100 %, encontrándose el valor más alto en pH 6.8; con esto, y observando que el pH no influye en el comportamiento de la solubilidad de Espironolactona (ver *Figuras XVIII* y *XIX*), se opta por evaluar un medio de disolución a pH 6.8.

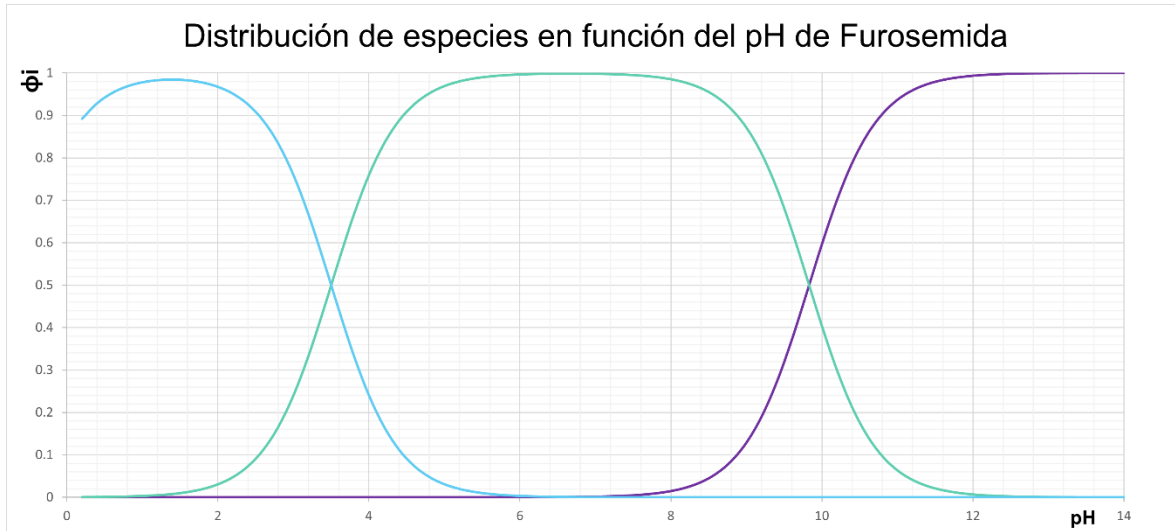


Figura XVII. Diagrama de distribución de especies en función del pH de Furosemida.

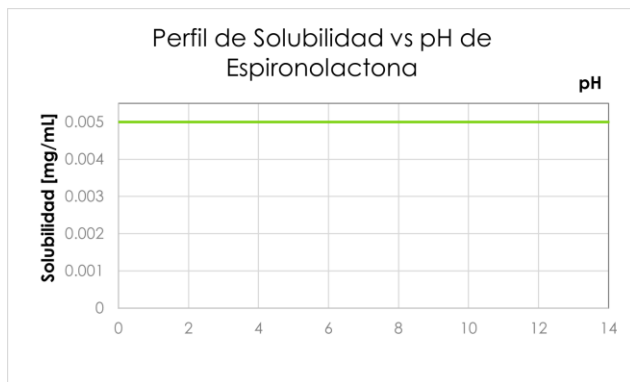


Figura XVIII. Perfil de Solubilidad vs pH de Espironolactona

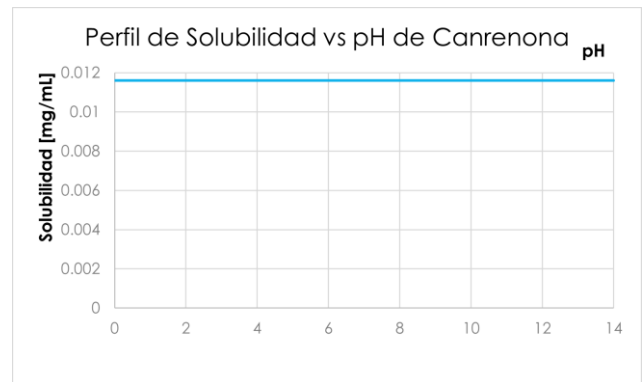


Figura XIX. Perfil de Solubilidad vs pH de Canrenona

Para controlar el pH del medio, se propone utilizar la preparación del medio de acuerdo con la farmacopea mexicana; Buffer de fosfatos pH 6.8.

Considerando los datos de solubilidad de ambos principios activos, se propone utilizar 900 mL o 1000 mL como volumen del medio de disolución para cada vaso de disolutor, con ese volumen se cumple con el uso de condiciones Sink.⁴⁹

Como se observa en la **Figura XIII**, la molécula de Espironolactona no contiene grupos que sean ionizables, lo que puede respaldar la baja solubilidad. Considerando esto, se propone utilizar un agente tensoactivo que favorezca la solubilidad de la Espironolactona y/o Canrenona en el medio propuesto. Existen tres

tipos de tensoactivos: No iónicos, aniónicos y catiónicos, esta clasificación depende de las cargas que contenga la molécula del tensoactivo.⁵⁰

Se propone utilizar Lauril sulfato de sodio a una concentración < 3.92 mM, que es la Concentración Micelar Crítica⁵⁰; esto con el objetivo de lograr el efecto de mejorar la solubilidad de la Espironolactona.

Finalmente, la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, por sus siglas en inglés) en su capítulo <1092> sugiere el uso del aparato I ó II para la evaluación de cápsulas o tabletas de liberación inmediata. Y, con respecto a la velocidad, sugiere el uso de 50 – 75 rpm en aparato 2.⁵¹

Debido a que ambas moléculas tienen dobles enlaces en su estructura, se opta por realizar la cuantificación en un sistema HPLC con detector UV.

Robustez y optimización del método analítico

Para realizar la optimización del método analítico y establecer la Región de Diseño Operativa del Método (MODR) se utiliza un Diseño factorial 2^k , el cual contempla una serie de experimentos considerando dos o más factores (pH, temperatura, tiempo de agitación, etc.) a diferentes niveles (alta y bajo). En este caso de estudio, el número de factores es $k = 3$ y dos niveles (alto y bajo).

La preparación del Medio de disolución Buffer de fosfatos pH 6.8 se realiza bajo la indicado en el capítulo de Soluciones Amortiguadoras de la farmacopea mexicana, el cual se describe a continuación⁵²:

SA de fosfatos pH 6.8

En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver 3.40 g de Fosfato monobásico de potasio y 3.55 g de Fosfato dibásico de sodio en agua. Llevar a volumen con agua.

Se realiza una modificación a utilizar únicamente sales de sodio, ya que, se ha observado que, a ciertas concentraciones, el Lauril sulfato de sodio se precipita con sales de potasio⁵¹, además de que, la cantidad de sales es más alta con respecto a las de sodio, lo que puede ocasionar precipitación en tuberías del equipo cromatográfico, así como taponamientos en la columna cromatográfica.⁵³

Asimismo, se realiza la adición de Lauril sulfato de sodio a concentración de 0.1 % p/v, es decir, 1 g por cada litro de volumen de medio.

Los factores que se evaluarán en el diseño de experimentos sólo serán aplicados a la Disolución *per se*, esto con el fin de describir la aplicación de AQBd. La cuantificación en HPLC puede tener otro diseño de experimentos.

El diseño de experimentos se encuentra resumido en la **Tabla VIII**.

Tabla VIII. Factores y niveles para diseño de experimentos de optimización del método analítico de Disolución para Furosemida/Espironolactona Cápsulas.

Nivel	Alto	Bajo
Factor		
Volumen del medio	1000 mL	900 mL
Velocidad de agitación	100 rpm	75 rpm
Concentración de Lauril sulfato de sodio	0.1 % p/v	0 % p/v

Uno de los objetivos de un diseño de experimentos es que se disminuya(n) el(los) error(es) sistemático(s) a través de la aleatorización. En un diseño factorial, este proceso se realiza de acuerdo con la **Figura XX**.⁵⁴

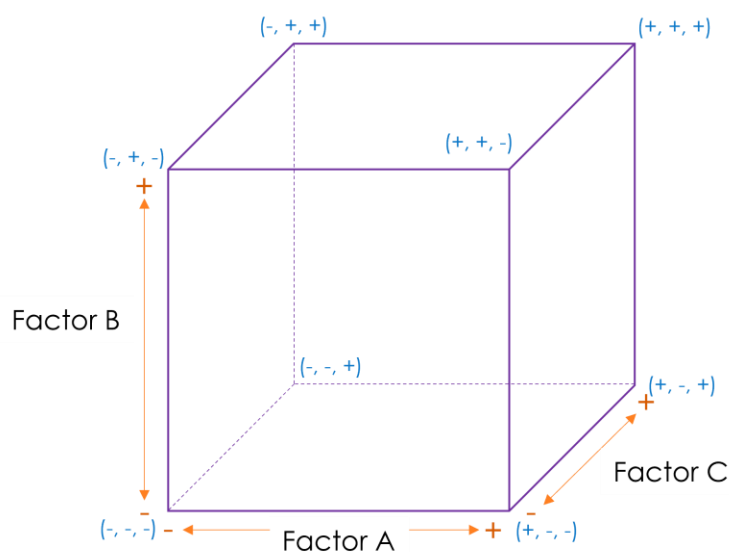


Figura XX. Aleatorización de experimentos para optimización del método analítico de Disolución de Furosemida/Espironolactona.⁵⁴

El Factor A es la Velocidad de agitación, Factor B es el Volumen del medio y Factor C es Concentración de tensoactivo. El símbolo “+” indica nivel alto del factor, caso contrario, el signo “-” indica nivel bajo del factor. Al tener dos niveles y tres factores, el número de experimentos será de 8, es decir:

$$2^k = 2^3 = 8$$

Cada experimento debe mantener otras variables que no estén consideradas en el diseño de experimentos de manera constante, por ejemplo, concentración de sales, tipo de aparato, etc. Y se realiza de acuerdo con la **Tabla IX**.

La ejecución de cada experimento no necesariamente debe ser tal cual se describe en la **Tabla IX**, puede ser aleatorio siempre y cuando se mantengan bien identificados los experimentos, como en la **Figura XXI**.

Tabla IX. Resumen de experimentos para la optimización del método analítico de Disolución para Furosemida/Espironolactona Cápsulas.

Experimento	Factor A	Factor B	Factor C	Factor A	Factor B	Factor C
1	-	-	-	75 rpm	900 mL	0 % p/v
2	+	-	-	100 rpm	900 mL	0 % p/v
3	-	+	-	75 rpm	1000 mL	0 % p/v
4	+	+	-	100 rpm	1000 mL	0 % p/v
5	-	-	+	75 rpm	900 mL	0.1 % p/v
6	+	-	+	100 rpm	900 mL	0.1 % p/v
7	-	+	+	75 rpm	1000 mL	0.1 % p/v
8	+	+	+	100 rpm	1000 mL	0.1 % p/v

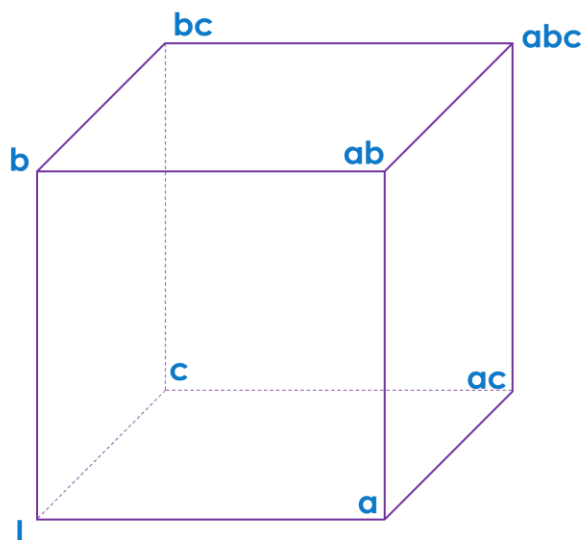


Figura XXI. Etiquetas de experimentos para la optimización del método analítico de Disolución para Furosemida/Espironolactona Cápsulas.⁵⁴

Una vez ejecutados los experimentos, se realiza el análisis estadístico de los resultados de cada experimento realizado. En este caso de estudio, al haber dos principios activos, se realiza un análisis estadístico por principio activo. Los resultados de Furosemida se encuentran en la **Figura XXII**.

Regresión factorial: Y vs. A, B, C

A)

Coeficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		95.63	*	*	*	
A	-2.007	-1.004	*	*	*	1.00
B	8.367	4.184	*	*	*	1.00
C	-1.4875	-0.7438	*	*	*	1.00
A*B	-2.027	-1.014	*	*	*	1.00
A*C	-1.3425	-0.6712	*	*	*	1.00
B*C	7.692	3.846	*	*	*	1.00
A*B*C	2.157	1.079	*	*	*	1.00

Análisis de Varianza

B)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	292.000	41.714	*	*
Lineal	3	152.516	50.839	*	*
A	1	8.060	8.060	*	*
B	1	140.030	140.030	*	*
C	1	4.425	4.425	*	*
Interacciones de 2 términos	3	130.175	43.392	*	*
A*B	1	8.222	8.222	*	*
A*C	1	3.605	3.605	*	*
B*C	1	118.349	118.349	*	*
Interacciones de 3 términos	1	9.310	9.310	*	*
A*B*C	1	9.310	9.310	*	*
Error	0	*	*		
Total	7	292.000			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$Y = -186.0 + 3.154 A + 0.2997 B + 1487 C - 0.003348 A*B - 33.87 A*C - 1.482 B*C + 0.03452 A*B*C$$

Figura XXII. Análisis estadístico del Diseño de Experimentos de Furosemida. A) Regresión factorial. B) Análisis de Varianza.

En la **Figura XXII**, en la columna de Efecto, se pueden emitir dos interpretaciones, una es que, si el signo del valor del efecto es positivo, indica que, ese efecto ocasiona un aumento en la respuesta analítica, caso contrario, si el signo es negativo, la respuesta analítica se verá disminuida. Asimismo, entre mayor sea el valor del efecto, indica que mayor es el impacto de ese efecto sobre la respuesta

analítica. En el caso de Furosemida, la interacción de B con C es la que más impacta en la respuesta analítica, es decir, el Volumen del medio y la Concentración del tensoactivo incrementan el % disuelto de Furosemida. Para dar mayor soporte a esta premisa, se puede hacer uso de gráficos adicionales como Gráficos de interacción, como los que se muestran en las **Figura XXIII**:

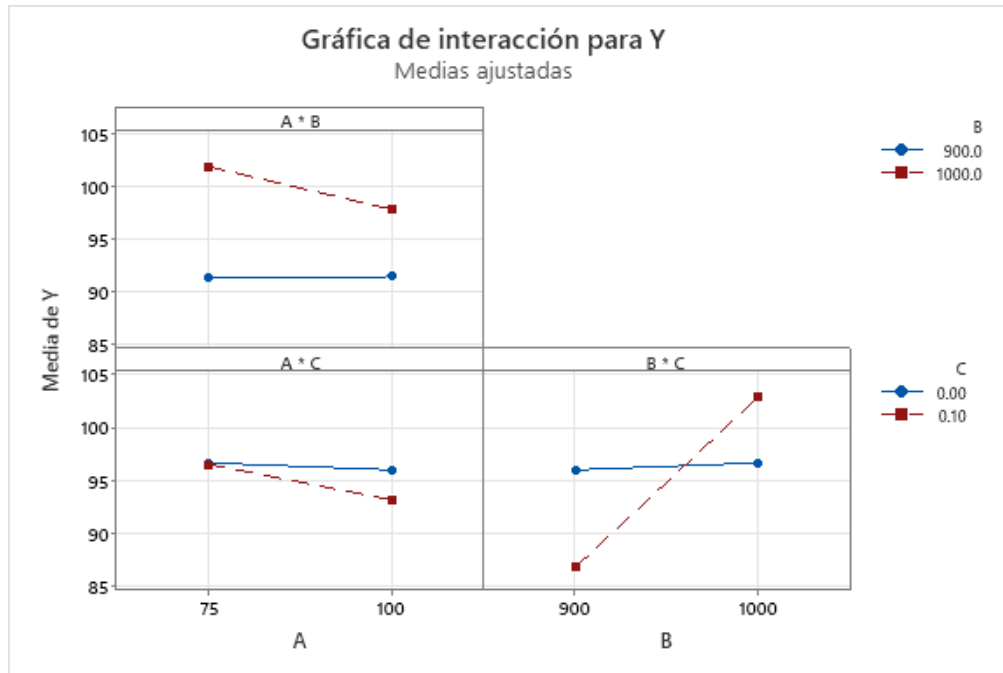


Figura XXIII. Gráficos de interacción de factores en el Diseño de Experimentos de Furosemida.

Como se observa en la **Figura XXIII**, el gráfico de interacción de B y C, hay un cruce de pendiente conforme aumenta el nivel de cada factor, esto indica que hay una interacción entre estos dos factores. Químicamente tiene sentido, ya que, la solubilidad de Furosemida es relativamente alta, por lo que, a mayor volumen, Furosemida se disuelve mejor, y aunado esto, la influencia del tensoactivo facilita aún más su comportamiento en el medio.

Para analizar cómo son las interacciones entre los factores, se hace uso de Gráficos de contorno y/o de Superficie generados a partir de la Ecuación de regresión en el análisis estadístico (ver **Figura XXII B**), como los mostrados en las **Figuras XXIV** y **XXV**.

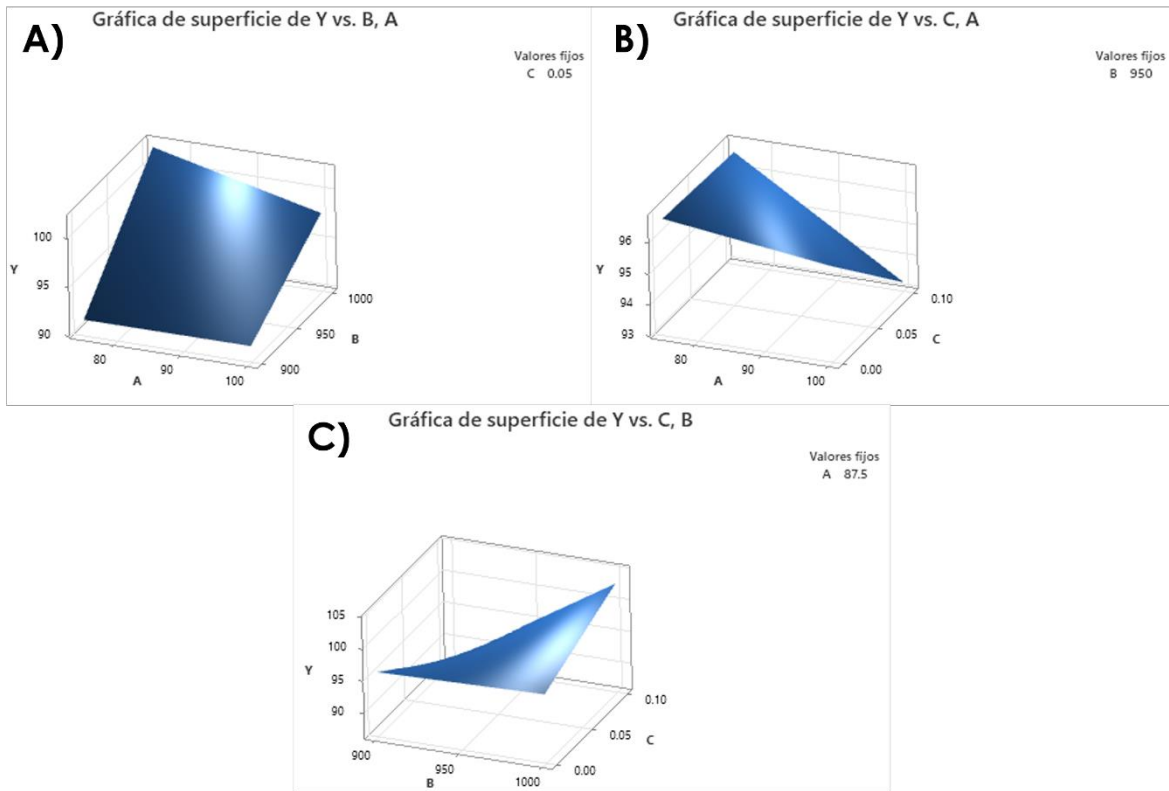


Figura XXIV. Gráficos de superficie en el Diseño de Experimentos de Furosemida.

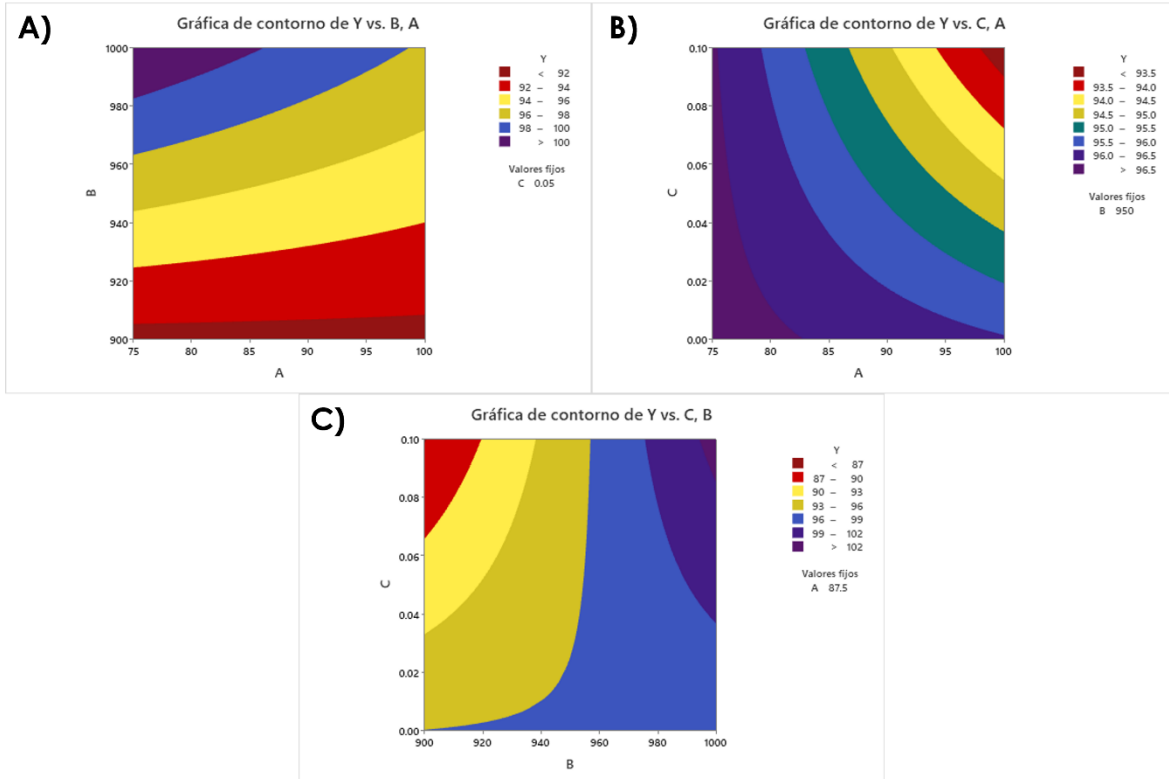


Figura XXV. Gráficos de contorno en el Diseño de Experimentos de Furosemida.

Tanto en los gráficos de superficie como en los de contorno, se puede analizar cómo se modifica la respuesta analítica en función del nivel en que se evalúen los factores manteniendo un factor fijo.

Los resultados del análisis estadístico para Espironolactona se muestran en las Figuras XXVI, XXVII, XXVIII y XXIX.

Regresión factorial: Y vs. A, B, C

A)

Coeficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante		69.43		*	*	*
A	0.4775	0.2388		*	*	1.00
B	16.817	8.409		*	*	1.00
C	56.62	28.31		*	*	1.00
A*B	-1.0625	-0.5312		*	*	1.00
A*C	-6.413	-3.206		*	*	1.00
B*C	4.207	2.104		*	*	1.00
A*B*C	-9.702	-4.851		*	*	1.00

B)

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	7	7285.38	1040.77	*	*
Lineal	3	6977.20	2325.73	*	*
A	1	0.46	0.46	*	*
B	1	565.66	565.66	*	*
C	1	6411.08	6411.08	*	*
Interacciones de 2 términos	3	119.90	39.97	*	*
A*B	1	2.26	2.26	*	*
A*C	1	82.24	82.24	*	*
B*C	1	35.41	35.41	*	*
Interacciones de 3 términos	1	188.28	188.28	*	*
A*B*C	1	188.28	188.28	*	*
Error	0	*	*		
Total	7	7285.38			

Ecuación de regresión en unidades no codificadas

$$Y = 471.8 - 6.291 A - 0.4787 B - 12689 C + 0.006912 A*B + 142.3 A*C + 14.43 B*C - 0.1552 A*B*C$$

Figura XXVI. Análisis estadístico del Diseño de Experimentos de Espironolactona. A) Regresión factorial. B) Análisis de Varianza.

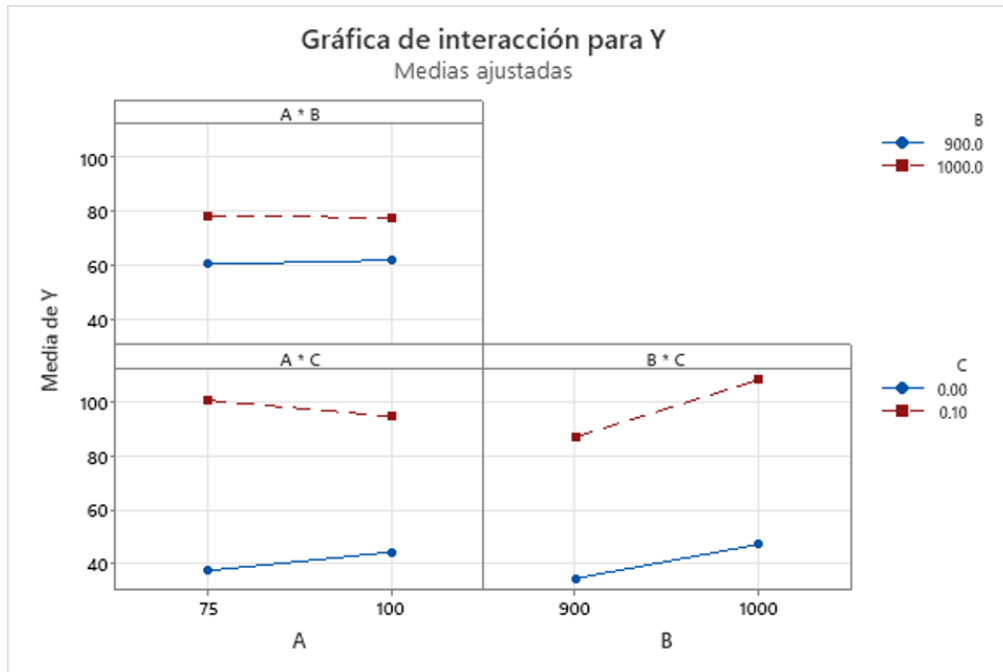


Figura XXVII. Gráficos de interacción de factores en el Diseño de Experimentos de Espironolactona.

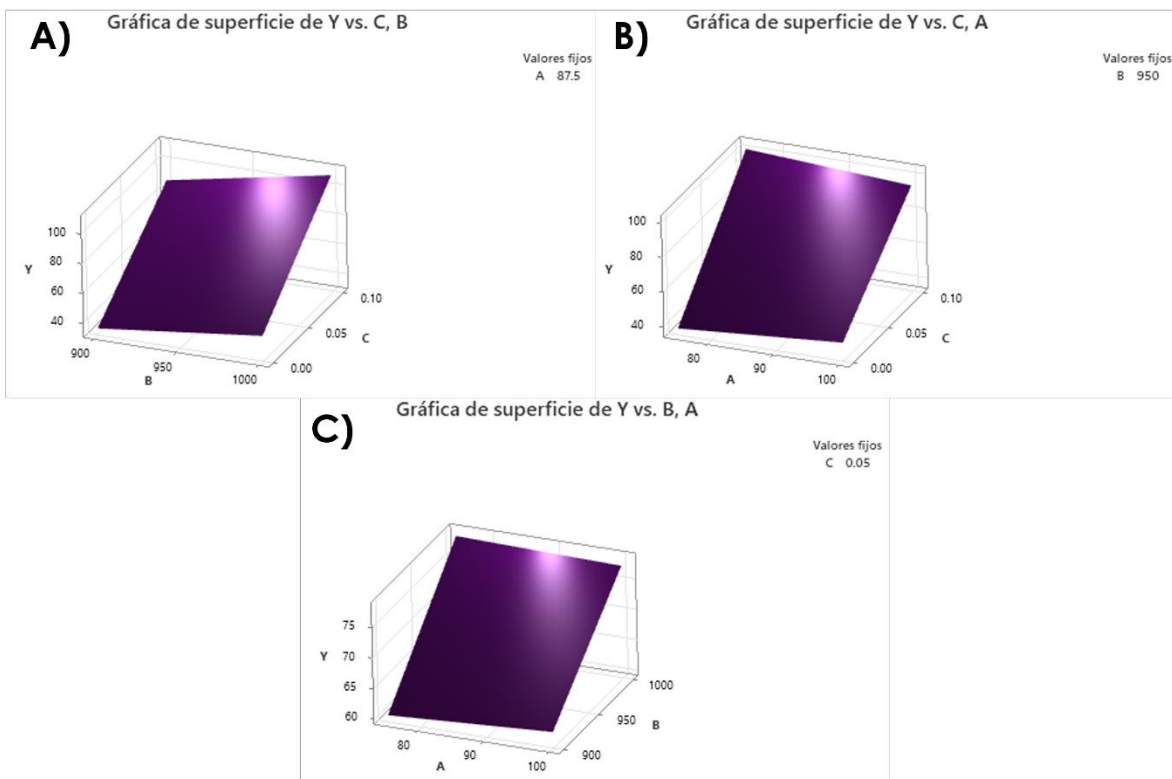


Figura XXVIII. Gráficos de superficie en el Diseño de Experimentos de Espironolactona.

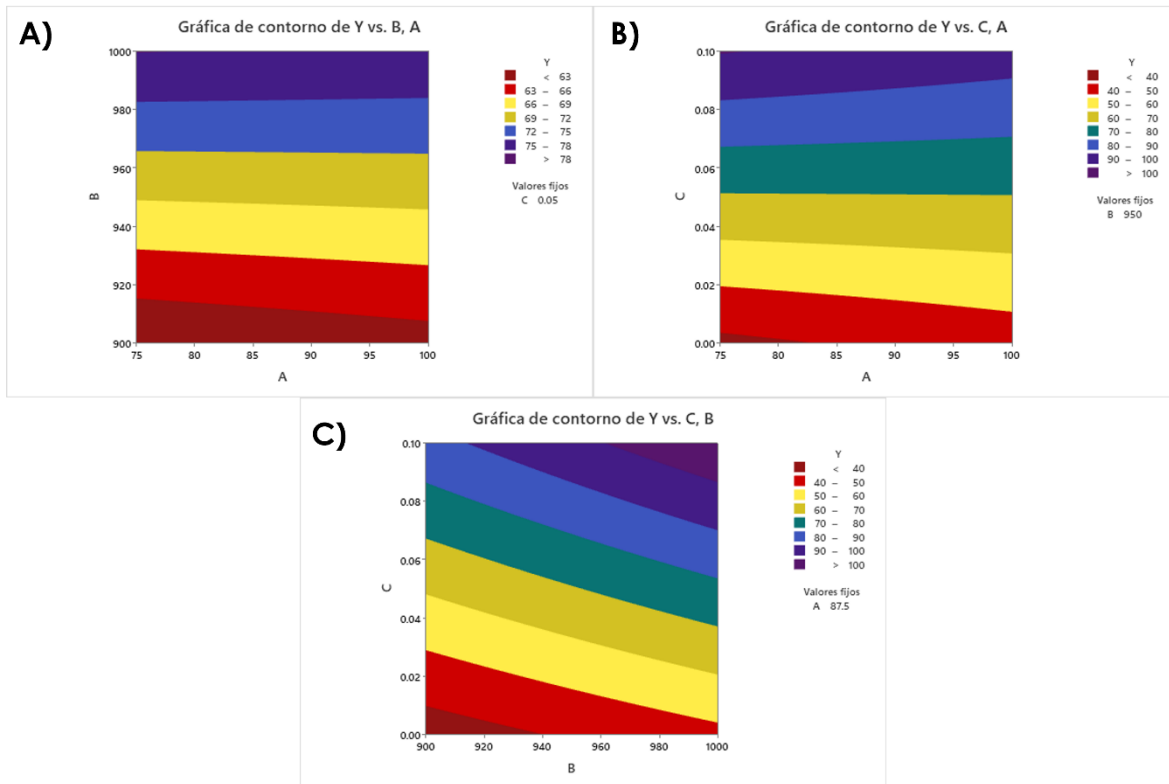


Figura XXIX. Gráficos de contorno en el Diseño de Experimentos de Espironolactona.

En el análisis de los gráficos de interacción de Espironolactona, no hay interacciones en combinaciones de dos factores, inicialmente indicaría que la modificación de cualquier factor en combinación no impacta en la respuesta analítica de Espironolactona, sin embargo, de acuerdo con los gráficos de contorno de la **Figura XXIX**, en un incremento de la concentración de Lauril sulfato de sodio, hay % disuelto cada vez mayores. Químicamente, Espironolactona al no tener grupos funcionales ionizables, de la única propiedad que puede apoyarse para aumentar su solubilidad es el uso de tensoactivos. El tensoactivo utilizado es Lauril sulfato de sodio que, como se mencionó anteriormente, es un tensoactivo no iónico, por lo que, aumentar su concentración en el medio facilita la solubilidad de Espironolactona.

Derivado del análisis estadístico de diseño de experimentos, las condiciones ideales en las que la respuesta analítica cumple con la especificación de cada uno de los principios activos (Q = 75 % para Espironolactona y Q = 80 % para Furosemida) son Velocidad de agitación de 87.5 rpm, Volumen del medio de 950 mL y Concentración de tensoactivo de 0.05 % p/v. Es importante considerar que tanto el laboratorio en

el que se desarrolló el método y el laboratorio al que se transfiera el método, cuenten con el material y equipos que puedan replicar estas condiciones de análisis para garantizar que los resultados sean confiables. Asimismo, es esencial la justificación técnico-científica con fines regulatorios, es decir, el criterio analítico del desarrollador deber ser tal que si un diseño de experimentos arroja resultados que tengan datos favorables estadísticamente, éstos también deben tener un significado químico-biológico adecuado, ya que, al presentarse ante entidades regulatorias, éstas hacen una evaluación de la validez del método desarrollado durante la revisión del expediente (*dossier*) de registro sanitario.

Verificación del desempeño del método analítico

Para la cuantificación de las muestras obtenidas en Disolución de Furosemida/Espironolactona Cápsulas, se establecieron a través de otro diseño de experimentos que arrojó las siguientes condiciones para una corrida cromatográfica:

Fase móvil	H ₃ PO ₄ 1 % v/v:Acetonitrilo 50:50
Flujo	1.8 mL/min
Temperatura de la columna	35 °C
Temperatura del automuestreador	15 °C
Columna	C18 4.6 x 250 mm, 5 µm de tamaño de partícula
Volumen de inyección	10 µL
Longitud de onda	260 nm

En el desarrollo del método analítico, en la cuantificación de ambos analitos se encontró la elución de un tercer pico, el cual corresponde a un excipiente de la formulación, por lo que, sólo eluye en las inyecciones de muestras. Sin embargo, durante la Calificación del método analítico se demostró que el método es específico, ya que, este pico no eluye al mismo tiempo de retención de ninguno de los principios activos. En la **Figura XXX** se muestran cromatogramas *tipo* de la Solución estándar y de Solución muestra en donde se indica la elución de los picos, así como el orden de elución y tiempos de retención.

El pico correspondiente al excipiente, denominado PB 1, eluye cercano al pico de Furosemida, por lo que, la resolución entre estos dos picos es un criterio para la verificación continua del desempeño del método analítico.

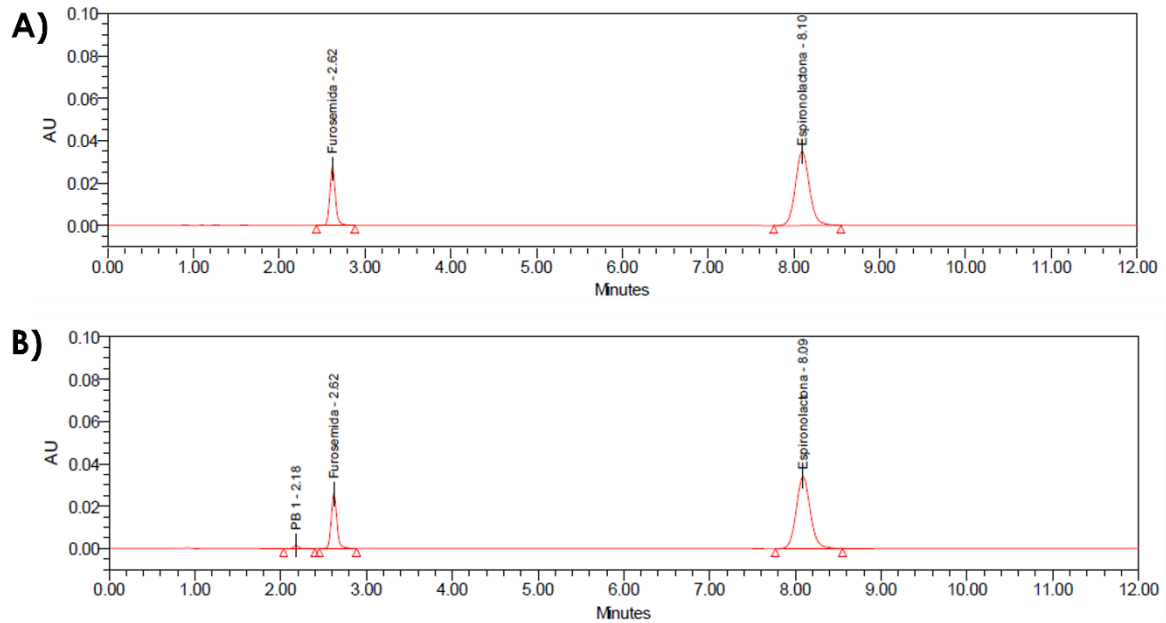


Figura XXX. Cromatogramas tipo de Solución estándar y Solución muestra de Furosemida/Espironolactona Cápsulas. **(A)** Solución estándar. **(B)** Solución muestra.

Al ser un método cromatográfico, se debe evaluar una adecuabilidad del sistema, de acuerdo con los resultados en la calificación del método analítico, los parámetros críticos, además de la resolución (R), de la Adecuabilidad del sistema son: Coleo (Tailing, T), Número de platos teóricos (N) y Coeficiente de variación (CV).

La estrategia de Verificación del desempeño del método analítico consiste en hacer uso de la Revisión Anual de Producto (RAP), en el cual se resumen, entre otras cosas, los lotes analizados de acuerdo con el Programa Anual de Estabilidades. En este documento se integra toda la información relacionada con cada lote fabricado de un producto, así como los resultados de los análisis de cada estación y de cada prueba de acuerdo con lo indicado en la NOM-073.

Dado que no hay un tiempo establecido para llevar a cabo la verificación continua del desempeño del método analítico, se opta por considerar los análisis de cada lote liberado, así como los análisis de cada estación de estabilidad de todos los lotes integrados en el Programa Anual Estabilidades (PAE).

Los valores por tomar en cuenta para la Verificación del desempeño del método analítico son:

- ✿ Promedio de % de disolución del número total de unidades de dosificación analizadas
- ✿ Coeficiente de variación de las muestras en el análisis

- ✿ Valor máximo obtenido en el análisis
- ✿ Valor mínimo obtenido en el análisis

Los datos recabados deben ser de cada lote analizado.

Y, de la Adecuabilidad del sistema de cada análisis se debe evaluar:

- ✿ CV de la respuesta cromatográfica de cada principio activo
- ✿ Coleo de cada pico correspondiente a cada principio activo
- ✿ Resolución del pico de Furosemida con respecto al pico PB 1

Se deben elaborar *Cartas control* con límites superior e inferior y evaluar si existen resultados fuera de estos. Las cartas control que se deben generar son del tipo *Cartas control para variables*, este tipo de cartas contemplan características de naturaleza *continua*, y permite observar y analizar el comportamiento del proceso analítico a través del tiempo.⁵⁵

Para el registro de los datos se deben generar cartas control \bar{X} o de medias y cartas *R* o de rangos. La carta \bar{X} permite detectar cambios significativos en la media del proceso y la carta *R* permite evaluar cambios en la amplitud de la dispersión.

Una herramienta útil durante el análisis de rutina en la industria farmacéutica es el análisis simultáneo de varios lotes bajo la misma Adecuabilidad del sistema. Si se presenta este caso, en el que se analicen más de 10 lotes en una misma corrida analítica, se debe hacer uso de cartas de control *S* o de Desviaciones estándar. Este tipo de cartas permiten identificar cambios pequeños del proceso a través de los límites superior e inferior a diferencia de las cartas *R*.

En caso de encontrar resultados fuera de los límites superior e inferior, se debe generar la investigación correspondiente considerando los riesgos establecidos en la gestión de riesgos generada en el desarrollo del método analítico, asimismo, se deben considerar los riesgos asociados a la fabricación del producto, así como de la formulación de este. Cualquier información que proporcione la causa-raíz de resultados atípicos. Es importante considerar Resultados Fuera de Especificación, Resultados Fuera de Tendencia y Resultados Fuera de Expectativa.

En caso de que existan cambios en fabricantes de reactivos, columna, equipo, equipo básico de laboratorio, etc., se deben realizar pruebas bien definidas que permitan concluir si el método analítico debe ser modificado o el cambio no tiene impacto en los resultados que éste genere. De la misma manera, se deben generar los Controles de cambio que apliquen en cualquier etapa del ciclo de vida del método analítico y documentar cualquier información obtenida del desempeño del método para la gestión del conocimiento del mismo producto o de otro.

CONCLUSIONES

- ✿ A pesar de que el concepto de Calidad por Diseño (QbD) fue generado por entidades regulatorias de diferentes partes del mundo, asociaciones farmacéuticas se dieron a la tarea de aplicarlo a un proceso como los métodos analíticos. Inclusive, entidades como la FDA han optado por incluirlo en la publicación de guías para cumplimiento regulatorio e integrarlo en un ciclo que va desde el desarrollo del método analítico hasta la validación y transferencia de este.
- ✿ El impacto sobre la concientización del desarrollo de métodos analíticos ha sido de tal magnitud que, dos tercios de las compañías farmacéuticas en el mundo han adoptado esta metodología de trabajar aunando herramientas como Gestión de riesgos, No conformidades/Desviaciones, planes CAPA y Control de cambios.
- ✿ Asimismo, este recurso es tan flexible que es posible utilizarlo no sólo en medicamentos de síntesis química, sino que es aplicable a vacunas, medicamentos biológicos, moléculas pequeñas, etc.
- ✿ Bajo el mismo esquema, la aplicación de Calidad Analítica por Diseño ha permitido robustecer el conocimiento acerca de los productos en los que se aplica, así como los procesos, que lo involucran.
- ✿ Este recurso se generó hace poco más de una década y, se ha planteado que la Calidad Analítica por Diseño y cada uno de sus elementos, como la gestión de riesgos, sean de carácter regulatorio para así, mejorar la calidad de vida de cada paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Secretaría de Salud. (2013). NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
2. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito, UNODC. (2012). Glosario de términos sobre garantía de calidad y buenas prácticas de laboratorio.
3. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Development Q8.
4. Secretaría de Salud. (2015). NOM-059-SSA1-2015, Buenas Prácticas de Fabricación de Medicamentos.
5. Aparicio, E. (2017). Técnicas colorimétricas. *Visión criminológica-criminalística*. 18-23.
6. Centro de Investigación en Geografía y Geomática "Ing. Jorge L. Tamayo", A.C CONACYT. Recordando medidas de tendencia central, de dispersión y de la forma.
7. González, I. (2014). Diseño de experimentos y su aplicación de la industria. *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Escuela Superior de Cd. Sahagún, Boletín Científico*. 1 (1).
8. Secretaría de Salud. (2023). Ley General de Salud.
9. Gutiérrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (2013). Control estadístico de la calidad y Seis Sigma. México DF: Mc Graw Hill Education. pp. 224.
10. USP online. Capítulo general. <1220> Ciclo de vida del procedimiento analítico. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M10975_02_02
11. Organización Mundial de la Salud. (2010). Serie de informes técnicos de la OMS. No. 957. Anexo I, Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de control de calidad de productos farmacéuticos.
12. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos-Biólogos. (2022). Guía de Validación de Métodos Analíticos.
13. Secretaría de Salud. (2015). NOM-073-SSA1-2015, Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios.
14. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Analytical Procedure Development Q14.

15. Rubinson, Rubinson, K. A., Aguilar Ortega, M. T., & Gyves Marciniack, J. de. (2000). *Química analítica contemporánea* (1a ed.). Pearson Educación. pp. 210-220.
16. Secretaría de Salud. (2020). NOM-001-SSA1-2020, Que instituye la estructura de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos y sus suplementos y el procedimiento para su revisión, actualización, edición y difusión.
17. Food and Drug Administration. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2022). Investigating Out-of Specification (OOS) Test Results for Pharmaceutical Production. Guidance for Industry.
18. ECA Academy. (2014). What is the difference between OOS / OOE / OOT? Recuperado de www.gmp-compliance.org
19. USP online. Capítulo general. <1224> Transferencia de Procedimientos Analíticos. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M5511_04_02
20. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures Q2.
21. USP online. Capítulo general. <1221> Verificación de Procedimientos Farmacopeicos. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M870_03_02
22. USP online. Capítulo general <541> Volumetría.
23. Riley, C. M., Rosanske, T. W., & Reid, G. L. (Eds.). (2020). *Specification of drug substances and products: development and validation of analytical methods*. Elsevier.
24. Peraman, R., Bhadraya, K., & Padmanabha Reddy, Y. (2015). Analytical quality by design: a tool for regulatory flexibility and robust analytics. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2015.
25. Deidda, R., Orlandini, S., Hubert, P., & Hubert, C. (2018). Risk-based approach for method development in pharmaceutical quality control context: A critical review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 161, 110-121.
26. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Quality Risk Management Q9.
27. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, ICH. Harmonised Tripartite Guideline. Pharmaceutical Quality System Q10.
28. International Organization of Standardization/ International Electrotechnical Commission. (2018). ISO/IEC 17025 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
29. EURACHEM/CITAC. (2012). *Guía CG4 Cuantificación de la Incertidumbre en Medidas Analíticas*.

30. USP online. Capítulo general <11> Estándares de referencia USP. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M98740_03_02
31. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 13ª edición, México. (2021). Apéndice III. Validación de métodos analíticos Recomendaciones para su presentación ante la FEUM. pp. 915-929.
32. USP online. Capítulo general. <1225> Validación de procedimientos farmacopeicos. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99945_04_02
33. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos FEUM. (2021) Apéndice V. Principios generales de Buenas Prácticas de Laboratorio. pp. 995-1008.
34. Organización Mundial de la Salud. OMS Serie de Informes Técnicos, No. 902, 2002. Informe 36, Anexo 3. Buenas prácticas para Laboratorios Nacionales de Control Farmacéutico.
35. Hallow, D.M., Mudryk, B.M., Braem, A.D. et al. An Example of Utilizing Mechanistic and Empirical Modeling in Quality by Design. *J Pharm Innov* 5, 193–203 (2010). <https://doi.org/10.1007/s12247-010-9094-y>
36. USP online. Capítulo general <621> Cromatografía DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M99380_07_02
37. Ermer J, Aguiar D, Boden A, Ding B, Obeng D, Rose M, Vokrot J. Lifecycle management in pharmaceutical analysis: How to establish an efficient and relevant continued performance monitoring program. *J Pharm Biomed Anal*. 2020. doi: 10.1016/j.jpba.2019.113051
38. Borman, P., Mahr, A., Weitzel, J., Thompson, S., Ermer, J., Sproule, S., Roussel, J., Marach, J., Pappa, H. Ongoing Analytical Procedure Performance Verification—Stage 3 of USP <1220>. *Pharmaceutical Technology*. 2023. 47 (3). pp. 40-44.
39. Vukovinsky, K.; Watson, T.; Ide, N.; et al. Statistical Tools to Aid in the Assessment of Critical Process Parameters. *PharmTech*. 2016, 40 (3), 34–44.
40. Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ª ed. 2016).
41. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 13ª edición, México. (2021) Apéndice X. Transferencia de métodos analíticos. pp. 1033-1035.
42. Listado de Medicamentos de referencia. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) Secretaría de Salud. (2023).
43. Buitrago, A., Calderón, L., León, A., Brunetto, R., & Galignani, M. (2010). Desarrollo y validación de un método espectrofluorométrico para la determinación de furosemida en formas farmacéuticas sólidas. *Avances en química*, 5(1), 15-25.
44. Furosemide. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00695>.
45. Spironolactone. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00421>.

46. Karim, A. (1978). Spironolactone: disposition, metabolism, pharmacodynamics, and bioavailability. *Drug metabolism reviews*, 8(1), 151-188.
47. Sadee, W., Abshagen, U., Finn, C., & Rietbrock, N. (1974). Conversion of spironolactone to canrenone and disposition kinetics of spironolactone and canrenoate-potassium in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 283, 303-318.
48. Product monograph. Including patient medication information. LASIX® ORAL SOLUTION. Furosemide Oral Solution, 10 mg / mL, Oral.
49. Becerril-Ruiz, V. H., Ortiz-Reynoso, M., & Santillán-Benítez, J. G. (2018). Historia de la regulación de los medicamentos genéricos en México: 1977 a la fecha. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 21.
50. Jiménez Islas, D., Medina Moreno, S. A., & Gracida Rodríguez, J. N. (2010). Biosurfactant properties, applications and production: a review. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26(1), 65-84.
51. USP online. Capítulo general. <1092> Procedimiento de disolución: desarrollo y validación. USP, DocId: 4_GUID-CE0902BA-77AC-422D-8BF0-A221B5DE6012_5_es-ES
52. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 13ª edición, México. (2021) Soluciones y reactivos. p. 193.
53. Agilent Inc. Prácticas recomendadas en la utilización de un sistema de LC de Agilent. (2016) 7ª edición.
54. Montgomery, D. C. (1991). Diseño y Análisis De Experimentos (1a. ed.). México: Limusa Wiley. pp. 228-240.
55. Gutiérrez Pulido, H., & de la Vara Salazar, R. (2013). Control estadístico de la calidad y Seis Sigma. México DF: Mc Graw Hill Education. pp. 174-190.