



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN QUÍMICA DEL PROCESO DE LIMPIEZA EN UNA AREA DE INYECTABLES POR HPLC

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

OLVERA GÓMEZ VALERIA ARANY

Director: Q.F.B. Marciana Estrada González

Asesor: Q.F.B. Víctor Hugo Becerra López





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.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por darme todo el apoyo necesario para culminar este gran sueño aunque eso implicara en ocasiones grandes sacrificios, por siempre creer en mí, por inspirarme con su ejemplo a nunca darme por vencida y por todo el amor que me ha brindado, **gracias mamá** porque sin ti nada de esto sería posible. Por eso hoy te entrego esta tesis como símbolo de mi gran agradecimiento.

Profesores, **Víctor e Isabel**; a través de este trabajo quiero agradecer su apoyo incondicional, la gran motivación que siempre me inspiraron, toda la fuerza que me dieron para nunca rendirme, así como toda la guía, cariño y amistad que me han brindado durante todo este tiempo.

Gracias abuelitos, **Silvia y Antonio** por siempre confiar en mí, por siempre estar conmigo en los buenos y también en los malos momentos, por todo su cariño y motivación.

A **Marcia y Lucy** por el apoyo incondicional a lo largo de la realización de esta tesis y por compartir conmigo toda su experiencia para hacer de mí una mejor profesionalista.

A mis sinodales, **Irma y Lourdes**; por compartir toda su experiencia y tiempo para la mejora de este trabajo.

Ignacio gracias, por siempre estar a mi lado y brindarme todas las fuerzas necesarias para enfrentar los retos que la vida nos ha puesto, por enseñarme que todos los sueños se pueden volver realidad y que la vida se debe tomar con calma para poderla disfrutar, pero sobre todo gracias por todo el AMOR que me has demostrado, el cual ha sido sin duda mi gran motivación.

Luis Antonio y Aldo, por los grandes momentos y su gran apoyo a lo largo de la carrera, pero sobre todo gracias por la gran amistad que me han demostrado.

A todos **mis tíos y primos**, por todos los momentos, enseñanzas, gran cariño y el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

A el laboratorio **Bonoplast S.A. de C.V.** por darme la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. FUNDAMENTACIÓN	3
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
IV. OBJETIVOS	35
V. HIPÓTESIS	36
VI. METODOLOGIA	39
VII. RESULTADOS	40
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
IX. CONCLUSIONES	52
X. RECOMENDACIONES	53
XI. REFERENCIAS	54

RESUMEN

El proceso de limpieza es un punto crítico en cualquier empresa dedicada a la fabricación de medicamentos principalmente en aquellas que utilizan equipos multiusos para la fabricación y/o llenado de diferentes productos, es por esto que surge la necesidad de validar los procesos de limpieza para garantizar que no existirá una contaminación cruzada entre los productos que se fabriquen en un área y equipos compartidos.

La finalidad de este trabajo fue optimizar la validación del proceso de limpieza en 12 puntos del área de inyectables de una empresa maquiladora de productos farmacéuticos, al evaluar su efectividad por medio de un método analítico validado de CLAR.

Se demostró que la CLAR es un método analítico sensible y de utilidad para asegurar que no existe dependencia entre los diferentes puntos de muestreo de limpieza del área de inyectables en estudio y el proceso de limpieza ejecutado por diferentes personas, logrando ,a través de ésta, evaluar la optimización y el cumplimiento de las especificaciones para la validación del proceso de limpieza en el área de inyectables de una empresa farmacéutica, establecidas en la NOM 059-SSA1-2006 y asegurando con esto que el proceso de limpieza cumple con el fin con el que fue creado, la ausencia o disminución a límites de aceptación de sustancias y partículas no deseables cuyo efecto sea adverso al producto o proceso.

I. INTRODUCCIÓN

La limpieza en una industria farmacéutica es de gran importancia, pues el propósito de la limpieza es eliminar residuos de activo, excipientes, mezcla de ambos, detergentes o alguna otra sustancia con lo que se puede asegurar que el medicamento que se va a fabricar no sufrirá contaminación.

Sin embargo, para poder asegurar que un proceso de limpieza funciona y pueda garantizar que después de efectuarse no surgirá contaminación en el siguiente producto a fabricar, el proceso de limpieza debe validarse.

La validación de la limpieza es un punto crítico en cualquier empresa dedicada a la fabricación de medicamentos y principalmente en empresas que utilizan equipos multiusos (fabricación de diferentes productos en un solo equipo).

El proceso de limpieza en el área de fabricación de inyectables de una empresa maquiladora de productos farmacéuticos, necesita ser actualizado y validado de acuerdo a las necesidades de fabricación de la empresa con la finalidad de confirmar su efectividad.

Ante esta situación surge la necesidad de optimizar la validación del proceso de limpieza en el área de inyectables en conformidad con la NOM 059-SSA1-2006 de una empresa maquiladora de productos farmacéuticos.

La finalidad de este trabajo es optimizar la validación del proceso de limpieza en el área de inyectables de una empresa maquiladora de productos farmacéuticos, evaluando su efectividad por medio de un método analítico validado de CLAR. La CLAR es de utilidad para demostrar que no existe dependencia entre los diferentes puntos de muestreo de limpieza de un área estéril y el proceso de limpieza ejecutado por diferentes personas, logrando a través de esta evaluar la optimización y el cumplimiento de las especificaciones para la validación del proceso de limpieza en el área de inyectables de una empresa farmacéutica, establecidas en la NOM 059-SSA1-2006.

II. FUNDAMENTACIÓN

A. VALIDACIÓN

1. DEFINICIONES

La validación de acuerdo con la NOM-059-SSA1-2006, **“Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos”**, define a la validación como la “evidencia documentada que demuestra que a través de un proceso específico se obtienen un producto que cumple consistentemente con las especificaciones de calidad establecidas”.

Esta misma establece que los fabricantes de medicamentos deben determinar las actividades de validación que son necesarias para demostrar el control de los aspectos críticos de sus operaciones particulares.

Durante muchos años se ha hablado tradicionalmente de tres tipos de validación. En forma global y considerando antecedentes y nuevas perspectivas se puede hablar de cinco tipos de validación¹:

Las tradicionales:

- Validación prospectiva:

Se define como el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados obtenidos antes de que el producto involucrado en ese proceso salga al mercado.¹

- Validación retrospectiva

El estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados obtenidos con la información histórica del producto involucrado con el proceso en cuestión.¹

- Validación concurrente

Es el estudio que se lleva a cabo para demostrar y establecer una evidencia documentada de que un proceso hace lo que está previsto basado en resultados obtenidos paralelamente durante la distribución del producto que involucra al proceso en cuestión.¹

Las de aplicación actual:

- Validación esbelta

Esta validación se encuentra basada en resultados que consideran en su estudio la identificación de atributos críticos de la calidad.¹

- Validación en tiempo real, mejor conocida como “Verificación continua de la calidad”¹

En este tipo de validación el estudio se encuentra basado en resultados obtenidos lote a lote.¹

Sin importar que tipo de validación se realice, las empresas deben de contar con un Plan maestro de validación. El plan maestro de validación es un documento donde cada empresa plasma su filosofía y sentir hacia la validación, cuáles son sus objetivos y como pretende alcanzarlos, especifica la información referente a las actividades de validación que realizará, donde se definen detalles y escalas de tiempo para cada trabajo de validación a realizar.¹

El plan maestro de validación hará referencia a documentos particulares de apoyo, donde vendrán definidos los criterios específicos de trabajo, estos documentos se les conoce como protocolos. Los protocolos son documentos, que se revisan y autorizan antes de ser ejecutados, que describen la entidad bajo consideración, las pruebas planeadas y los criterios de aceptación. Una vez finalizada la prueba, el protocolo y los resultados sirven de base para documentar que la entidad funciona según lo previsto.¹

2. VALIDACIÓN DE PROCESOS

Esta validación puede dividirse principalmente en validación de procesos asépticos y validación de procesos no asépticos.¹

a) Procesos asépticos

Los productos asépticos tienen dos formas de liberarse al mercado:

- Esterilización terminal
- Llenado aséptico

La esterilización terminal como parte del proceso se considera como la más segura, sin embargo, muchos componentes, tanto materias primas, como materiales de

envase primarios, pueden sufrir alteraciones ante las condiciones a las que son sometidos como parte de la esterilización, por lo que se omite en muchos procesos.

Para dar confiabilidad a los productos, en el caso del llenado aséptico, se tiene que llevar a cabo la validación a través de pruebas de llenado aséptico simulado.

El llenado aséptico simulado se define como: la utilización de medio de cultivo en lugar de producto poniéndolo en contacto con el sistema contenedor cierre, bajo un ambiente y operaciones del proceso que reproduzcan las condiciones de operación normales.¹

1) Procedimientos de llenado aséptico

El medio de cultivo tiene que simular la actividad normal de llenado del producto, considerando todos los aspectos del proceso, incluyendo el tiempo de llenado.

Se debe representar el peor de los casos e incluir todas las manipulaciones e intervenciones probables a presentarse. El volumen de llenado de los contenedores deberá ser suficiente para estar en contacto con todas las superficies del contenedor incluyendo el cierre.

Las pruebas de simulación se deben efectuar en diferentes días y horas durante la semana y no solo al inicio de un día de trabajo.

El criterio de selección del medio de cultivo incluye: baja selectividad, concentración del medio y capacidad de ser filtrado. Así como, capacidad de evidenciar el crecimiento de un amplio tipo de microorganismos. Cuando se utiliza un medio de cultivo líquido, deberá prepararse de la misma forma que el producto, utilizando agua grado inyectable, determinar el pH del medio y de considerarse necesario deberá ser ajustado al rango requerido. El medio se filtrará en un filtro normal de producción.

Generalmente se requieren corridas o lotes representativos de 3000 unidades, pero no es obligatoria esta cantidad. Queda a criterio de la empresa la elección del tamaño más adecuado, con previa justificación, si no corresponde con el tamaño comercial.

Los contenedores serán incubados a 20°-25°C durante 14 días. Otra opción es incubarlos a esta temperatura durante 7 días, revisarlos y si no hay evidencias de contaminación posteriormente incubarlo a una temperatura no mayor a 35°C por 7 días adicionales.

Después del periodo de incubación, los contenedores se examinarán visualmente para evaluar si hay evidencia de crecimiento microbiano. Previamente se debe revisar que el sistema de cierre haya permanecido íntegro. El criterio de aceptación generalmente utilizado es no tener más del 0.1% de los contenedores con evidencia de contaminación con un nivel de confianza del 95%.¹

b) Procesos no asépticos.

Dentro de este tipo de procesos tenemos cuatro tipos:

- Procesos de producción (para formas farmacéuticas que no requieren control aséptico).
- Procesos de acondicionamiento.
- Procesos de almacenamiento.
- Procesos de distribución y transporte.

La validación de este tipo de procesos es más sencilla en el sentido de que no se requieren tantos controles, dadas las características de los productos involucrados. La selección adecuada de los parámetros críticos en cada proceso es fundamental.

Las actividades evaluadas serán representativas, de preferencia en tamaño comercial o como se realizan en forma rutinaria.¹

B. PROCESO DE LIMPIEZA

1. DEFINICIONES

La limpieza se define como el grado de aceptación de sustancias, partículas y microorganismos no deseables cuyo efecto sea adverso al producto o proceso. El proceso de limpieza aplica a todo equipo de fabricación, accesorios y áreas que tienen contacto directo con el producto o sus componentes.²

a) Grados de limpieza

El término grado de limpieza se aplica en base a la siguiente clasificación:²

- **Mínima o menor.** Se entiende mínima o menor cuando se procesan de manera secuencial lotes del mismo producto, a la misma o diferente concentración, siempre y cuando los lotes realizados hayan sido fabricados de menor a mayor concentración.²
- **Normal o mayor.** Cuando se procesan productos diferentes, cuando se concluya la fabricación de un lote y se requiera trabajar otro lote de diferente producto. Se recomienda después de un mantenimiento correctivo o preventivo a equipos y después de haber realizado 5 ó el número de limpiezas menores de forma consecutiva, que se determine de acuerdo al tipo de producto o proceso, basado en estudios.²
- **Exhaustiva.** Cuando proceda una limpieza especial, como después de una remodelación o mantenimiento programado ó correctivo.²

b) Tipos de limpieza

En la industria Farmacéutica se utilizan prácticas diversas para el proceso de limpieza de área de producción, sistemas, etc. Los métodos comúnmente empleados pueden dividirse en: proceso de limpieza manual, semiautomático y automático.²

1) Proceso de limpieza manual

Este tipo de procesos depende en alto grado del operador, por esto es de vital importancia que se cuente con la capacitación y calificación correspondiente para llevar a cabo dichos procesos.²

Este tipo de proceso es aun de los más utilizados en la industria farmacéutica. En cualquier tipo de proceso es de gran interés encontrar métodos para reducir todas o la mayoría de las fuentes de variación.²

Si solo se dispone de un operador para realizar la limpieza entonces el diseño de la validación de la limpieza debe incorporar la variabilidad de un mismo operador, teniendo que limpiar la misma pieza de equipo en múltiples corridas. Cuando se dispone de más de un operador, debe tratar de incorporarse ambos tipos de variabilidad dentro del diseño. Debido a la dificultad de la limpieza ó a condiciones de seguridad, la limpieza de algunas piezas de equipo puede requerir más de un operador. En tales casos, cada pieza de equipo debe limpiarse mediante diferentes combinaciones de operadores seleccionados al azar.²

Los procedimientos de limpieza manuales generalmente incluyen las siguientes etapas para su realización:²

- **Desarmado del equipo** (Sí es necesario). Muchos equipos o instalaciones requieren de ser desarmados para facilitar su limpieza.²
- **Pre-lavado-Inspección.** Esta es una de las etapas más importantes y es usualmente la que más depende del operador. El propósito es eliminar los materiales residuales de gran tamaño.²
- **Lavado.** En esta etapa incluye el lavado de cada pieza con agentes químicos, los cuales deben tener bien definida su concentración. En este paso generalmente los residuos materiales se eliminan por disolución. Cabe destacar que en este paso la temperatura del agua es un factor importante.²
- **Enjuague inicial.** Es en este paso donde generalmente se disuelven la mayoría de los residuos materiales. Para el enjuague inicial es preferible el uso de agua purificada, agua destilada o agua para inyección, sin embargo el uso del agua potable es válido siempre y cuando se demuestre que ésta es suficiente para obtener buenos resultados. En este paso debe especificarse si la temperatura del agua es importante.²
- **Enjuague final.** El enjuague final es usado para reducir los residuos a su nivel final sin introducir ningún contaminante potencial, por esta razón el enjuague final debe realizarse usando agua de alta calidad (agua purificada o agua para inyección).²
- **Rearmado.** (Sí es necesario). Las instrucciones y orden del rearmado deben incluirse en el procedimiento normalizado de limpieza.²

2) Proceso de limpieza semiautomático.

Este tipo de procesos se encuentran automatizados parcialmente y requieren de la intervención de un operador. Se incluyen los sistemas portátiles de Limpieza En Sitio (LES) y de tipo gabinete.²

Entre los sistemas portátiles tenemos lavadoras utilizadas para la limpieza de uniformes, tanques con bombas y los de tipo gabinete con maquinas estacionarias. Si es necesario el uso de detergentes estos pueden ser adicionados por el operador al tiempo de uso en un tanque separado.²

3) Proceso de limpieza automático.

Estos procedimientos ofrecen la ventaja de ser reproducibles y reducen la dependencia del operador, sin embargo, reduce también su habilidad para interceder durante el procedimiento para inspección en varias etapas y repetir algún paso si es necesario.²

Los equipos automáticos más comunes son sistemas LES diseñados para llevar a cabo procedimientos muy extensos o para limpiar piezas estacionarias de equipos.²

Estos sistemas requieren de los siguientes puntos:

- **Calificación del sistema de control.** Debe verificarse la eficacia y reproducibilidad del sistema.²
- **Consideraciones de muestreo.** Los sistemas LES son sistemas cerrados por lo que no pueden ser observados y muestreados sin interrumpir el programa y detener la secuencia de eventos.²
- **Suministro de materiales.** Los sistemas completamente automatizados tienen tanques, bombas, tubería, etc., por separado, que requieren el suministro de agua, agentes de limpieza, ácidos o bases, etc., para su distribución.²

c) Materiales y agentes de limpieza

Los materiales más comúnmente empleados. Se dividen en:

- **Materiales para llevar a cabo la limpieza de áreas y equipo:** como lo son lienzos (que no desprendan partículas), jalador con mango de aluminio, acero y /o plástico y en caso necesario telescópicos (no de

madera), recipientes de acero inoxidable, atomizadores, esponjas y escobillones.²

- *Materiales utilizados por el personal para la limpieza:* guantes de hule, batas, mascarillas, mandiles, lentes de protección, uniforme para el proceso de limpieza, botas y casco en caso de que aplique.²

Los agentes de limpieza se utilizan para eliminar residuos que se adhieren a la superficie del equipo de fabricación y áreas debido a un fenómeno físico que no puede evitarse. Estos agentes de limpieza utilizados en la Industria Farmacéutica contienen solo sustancias con valores de dosis letal (DL)₅₀ no críticos.²

Es importante conocer tanto el proceso de fabricación, como la fórmula cualitativa del producto que se fabrica para elegir de manera adecuada los agentes de limpieza que requiera dicho proceso.²

Existen varios mecanismos para eliminar los residuos de fabricación y/o para la limpieza de equipos, áreas, sistemas, etc., incluyendo la acción mecánica, disolución, detergencia y reacción química. Las acciones mecánicas se refieren a cualquiera de las variedades de procesos no químicos incluyendo: cepillado, barridos y el arrastre de partículas con vapor de agua. También incluye el uso de hielo seco para remoción química.²

La disolución emplea solventes orgánicos o agua para disolver los residuos, y ésta puede mejorar su actividad por medio del uso de aditivos específicos. La clave de la detergencia es el uso de surfactantes, usualmente en sistemas acuosos. Las acciones primarias de la detergencia son: absorción del agua, emulsificación y dispersión.²

Otro mecanismo para la limpieza involucra las reacciones químicas; la naturaleza química básica del residuo se cambia, usualmente por rompimiento de las moléculas grandes en pequeñas que pueden ser más fácilmente eliminadas por la acción del detergente.²

Aunque cada uno de estos mecanismos separados, durante el proceso de limpieza pueden ser combinados. Existe una gama amplia de agentes de limpieza, los cuales de acuerdo a su estructura química o a su uso comercial.²

Por su estructura química se clasifican en:²

- Constructores: Polifosfatos, fosfonatos, gluconatos, citratos, etilendiaminotetracético (EDTA), Nitrilotriacetato (NTA).
- Surfactantes: Compuestos cuaternarios de amonio.
- Agentes complejantes: Nitrilacetato, o Etilendiaminotetracético.
- Agentes secuestrantes: Fosfonatos, polifosfonatos.

- Desespumantes: Etoxilados de óxido de propileno.
- Agentes oxidantes: Donadores de oxígeno e hipocloritos.
- Inhibidores de corrosión: silicatos, carbohidratos modificados y fosfonatos.
- Agua purificada (caliente, fría).
- Agua para inyección (caliente, fría).
- Sustancias ácidas diluidas: Solución de Ácido Clorhídrico, Solución de Ácido Sulfúrico.
- Soluciones alcalinas como solución de hidróxido de sodio.
- Solventes como etanol, propanol, etc.

De acuerdo a su uso se pueden clasificar en:²

- Agentes alcalinos: generalmente contienen agentes secuestrantes, son humectantes, constituido de alcalinos secuestrantes, son humectantes, dispersantes y emulsificantes, biodegradables de baja espuma y se usan para superficies brillantes.
- Agentes alcalinos clorados: son humectantes, secuestrantes y dispersantes, de baja espuma, solubilizan proteínas y azúcares, eliminan grasa y materia prima, trabajan bien incluso a bajas temperaturas.
- Agentes ácidos: son detergentes concentrados a base de ácido fosfórico, que funcionan como aditivos humectantes e inhibidores de

corrosión; son de baja espuma, algunos son tensoactivos, biodegradables, y se usan para superficies brillantes.

2. EVALUACIÓN DEL PROCESO DE LIMPIEZA

El proceso de limpieza debe ser evaluado de tal forma que se demuestre su efectividad mediante la validación de este. La validación en general tiene como propósito establecer evidencia documental de que un proceso específico cumple consistentemente con los objetivos para los que fue diseñado.²

En el caso de los proceso de limpieza el objetivo es que el siguiente lote de producto fabricado no sea contaminado por cualquier fuente ya sea química o microbiológica. A su vez esta evidencia documental contempla un método de muestreo efectivo, una adecuada frecuencia de muestreo, un método analítico apropiado y el establecimiento de un criterio de aceptación. Una vez validado se establece un sistema de control rutinario.²

a) Calificación del personal²

Este es un punto fundamental para poder evaluar el proceso de limpieza y consiste básicamente en tres niveles o tipos de comprobación de conocimientos y desempeño.

El primero puede considerarse como un examen escrito, donde se hacen una serie de preguntas que tienen que ser contestadas por las personas en evaluación. Los exámenes de opción múltiple pueden ser prácticos, y permiten respuestas simples, directas, uniformes, generando conclusiones objetivas, claras y que pueden ser usadas para tomar acciones de refuerzo para aumentar el grado de complejidad gradualmente. Con este tipo de evaluaciones se mide que tanto los participantes conocen sobre los procedimientos de limpieza.

El segundo tipo de evaluación es una pequeña entrevista donde el supervisor o la persona designada como evaluador hace preguntas con el fin de comprobar que las personas comprenden por qué se llevan a cabo los procedimientos. Las personas en evaluación deben explicar con sus propias palabras las respuestas, es decir, no se pretende que repitan de memoria los procedimientos u otros conceptos relacionados.

El tercer tipo de evaluación tiene como propósito comprobar que el personal sigue y ejecuta adecuadamente las indicaciones del procedimiento, para ello se deben de llevar acabo auditorias de cumplimiento de procedimientos de manera individual con cada operario.

b) Tipos de muestreo

Se pueden utilizar tres métodos de muestreo para determinar el nivel de contaminación del equipo de producción. Es importante considerar las ventajas de todos los métodos y utilizarlos cuando sea más apropiado, ya sea para estudios de validación o en controles dentro del proceso para el proceso actual de limpieza. El método de muestreo debe acoplarse al equipo que se limpia y al objetivo de la validación de la limpieza.²

1) Muestreo con hisopo o por raspado de superficie

Las muestras son tomadas al azar en un área definida que esté en contacto con el producto. Los hisopos utilizados para este fin deben tener la característica de estar preparados con materiales inertes que no generen interferencias.

Se recomienda que estos hisopos se encuentren humedecidos preferentemente con agua purificada o agua HPLC ya que si se utiliza algún solvente orgánico se tiene el problema de demostrar la eliminación de estos de la superficie de los equipos.²

Al elegir el método de muestreo debe determinarse el porcentaje de recobro del método de extracción del hisopo y la efectividad del hisopo para recuperar residuos. Es de suma importancia la selección de los puntos de muestreo, deben considerarse aquellos puntos de difícil limpieza tales como: costuras de los equipos, empaques, piezas móviles en general.²

Una ventaja importante que presenta este tipo de muestreo es que aquellos activos que son insolubles en agua por ejemplo, pueden ser muestreados de esta forma, ejerciendo una acción mecánica y por arrastre lograr el recobro de los mismos.²

2) Muestreo por enjuague

Involucra el uso de un volumen conocido de agua para enjuagar el área de la superficie del equipo. En el agua de enjuague debe determinarse la cantidad

de residuos de un compuesto específico, no es aceptable realizar un análisis de rutina de acuerdo a la calidad de agua empleada. En múltiples casos, el diseño de los equipos dificulta la recolección de este tipo de muestras.²

Una ventaja de este tipo de muestreo es que se puede llegar a aquellas partes difíciles de limpiar y de muestrear, ya que si se realiza correctamente proporciona datos de la superficie total del equipo. Sin embargo el solvente empleado debe ser aquel que asegure una alta recuperación del compuesto de interés. Una desventaja es que para poder coleccionar la muestra se debe estar presente en la última etapa del proceso de limpieza y que el volumen con el que se realiza el enjuague final debe ser siempre el mismo.²

3) Muestreo por recirculación de solvente

Aplica a equipos mayores donde sea posible recircular el solvente- como lo son los tanques, tuberías, mezcladores- con el propósito de muestrear toda la superficie de los equipos; por ejemplo, un sistema tanque-tubería-bomba-centrífuga-tubería. En este método es necesario establecer:³

La magnitud total del área compartida de los equipos por el residuo y el o los productos, ya que es una información crítica a ser utilizada para determinar el límite analítico aceptable del residuo (LAAR).²

El solvente, en el cual debe ser soluble el residuo. El volumen del solvente, de tal forma que entre en contacto con toda la superficie de los equipos (tanques, reactores, mezcladores) y auxiliares (tubería, mangueras) a muestrear.²

La temperatura y tiempo de recirculación del solvente. El volumen de la muestra, así como los contenedores de la muestra (tubos de ensaye, matraces entre otros, incluyendo el cierre), su manejo y almacenaje entre el muestreo y su determinación.²

Es importante asegurar que un volumen mínimo del solvente de enjuague o recirculación que asegure el contacto con toda la superficie a muestrear.²

c) Indicadores del proceso de limpieza

Un proceso de limpieza se aplica a un equipo o a un conjunto de equipos y auxiliares, después de haber llevado a cabo la fabricación de un lote individual o de una

campana de fabricaci3n; por lo tanto, se sugiere establecer uno o m3s indicadores para evaluar la limpieza del equipo o equipos sometidos al procedimiento.³

Para llevar a cabo la validaci3n de los procesos de limpieza se tiene que seleccionar indicadores en las superficies con base en los residuos potenciales, considerando el enfoque de la contaminaci3n del siguiente producto a fabricar. Algunos de los criterios a considerar en funci3n del residuo, son los siguientes:³

- **Categoría:** Como fármacos, materias primas, materias primas alternas utilizadas en el proceso, agente de limpieza, solventes, sustancias de degradaci3n, lubricantes, biocarga, endotoxinas, sanitizantes o agua residual de enjuague.³
- **Actividad biológica:** Terapéutica, t3xica, alérgica, citot3xicas, entre otras.³
- **Potencia**³
- **Volatilidad**³
- **Cantidad a permitir en la superficie**³
- **Estabilidad**³
- **Interacci3n con componentes del equipo,** como lo son sellos, filtros, mangas, por mencionar algunos.³

De manera general los residuos m3s importantes para fines de validar los procesos de limpieza son las sustancias activas, componente específcico del detergente y sanitizante.³

1) Límites de aceptaci3n del residuo

Un enfoque apropiado útil para el desarrollo y validaci3n del método analítico es determinar los límites expresados como cantidad de residuo permitido por unidad de superficie, partiendo del contenido permitido de residuo en los productos que potencialmente puedan contaminar, es decir:³

Se define un residuo X proveniente de la fabricaci3n del producto A, donde X puede estar en contacto con las superficies de los equipos (1,2,..) utilizados para su fabricaci3n.³

Todos aquellos productos (B,C...) que no contengan X, que comparten superficies de equipos con el producto A, potencialmente pueden ser contaminados de manera cruzada por X.³

El límite máximo del residuo X en cada producto (B,C...) puede ser calculado con base en :³

- Propiedades farmacológicas.³
- Propiedades toxicológicas.³
- Referencias regulativas.³
- Nivel de 10 ppm.³

Dada la cantidad de lote del producto (B, C...), se debe calcular la cantidad del residuo X permitida para cada lote de producto (B, C...).³

Dada la superficie de los equipos compartidos (1, 2...) por cada lote de producto (B,C...) el límite máximo del residuo por superficie se obtiene al dividir la cantidad del residuo X permitida en el producto, respecto al área compartida de los equipos, el cual representa el límite de aceptación del residuo (LAR) y sus unidades son cantidad de residuo/área (g/m², mg/cm²).³

2) Sistemas de medición del residuo

Para determinar el residuo de la muestra es necesario utilizar un sistema de medición. Los sistemas de medición pueden ser clasificados en función de:³

- La naturaleza de la respuesta analítica en :
Sistemas físico-químicos. Cuando la respuesta es de tipo físico como lo es la absorción de luz, emisión de luz, voltaje, fotometría, fluorometría, o químico como consumo de iones – OH, consumo de un acomplexante, o alguna combinación de éstos. Entre estos sistemas tenemos, por ejemplo, cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cromatografía de gases (CG), cromatografía en capa delgada (CCD), ultravioleta, infrarrojo medio, volumetría, absorción atómica, turbidimetría, carbono orgánico total (COT), conductimetría, etc.³

Sistemas biológicos. Cuando la respuesta es de tipo biológico. Entre estos sistemas se encuentran la bioluminiscencia, ELISA, difusión en agar y cuenta microbiana.³

Sistemas organolépticos. Cuando la respuesta es de tipo olfativo, ocular o visual.³

- Su respuesta molecular en:

Sistemas selectivos. Cuando esta respuesta es específica a la molécula del residuo, por ejemplo, los sistemas cromatográficos, espectroscópicos, electroforesis capilar, ensayo enzimático de enlace inmunoabsorbente (ELISA), fotometría, entre otros. Generalmente este tipo de sistemas tienden a ser específicos.

Sistemas no selectivos. Cuando la respuesta es genérica a la molécula del residuo, por ejemplo, potenciometría, volumetría, conductimetría, gravimetría, osmolaridad, carbono orgánico total (COT). Generalmente, los métodos analíticos asociados a este tipo de sistemas tienden a ser inespecíficos.³

3) Selección del sistema de medición

Si el laboratorio farmacéutico cuenta con un método analítico para su determinación con un propósito diferente como, métodos analíticos para el control de materia prima, producto a granel, terminado, en estabilidad, entre otros, el sistema de medición de dicho método puede ser utilizado, siempre y cuando su límite de detección o cuantificación sea apropiado. Una de las ventajas de estos métodos es la especificidad del residuo a los otros componentes de la muestra, a continuación se muestra una tabla que describe algunos de los posibles sistemas de medición a utilizar en función del residuo.³

Tabla 1. Tipos de residuos y su sistema de medición.³

RESIDUO	SISTEMA DE MEDICIÓN
Fármaco	CLAR, CG, CCD, espectroscopía, COT, ELISA, electroforesis capilar, absorción atómica y fluorescencia.
Materia prima (excipientes, aditivos)	Volumetría, conductimetría, organoléptico, gravimetría, electroforesis capilar, espectroscopía, COT, CLAR, CCD.
Agente de limpieza	Absorción atómica, COT, potenciometría, organoléptico, osmolaridad, electroforesis capilar, espectroscopía, enzimáticos, cromatografía de iones, conductividad.
Sanitizantes	Absorción atómica, COT, organoléptico, potenciometría, osmolaridad, electroforesis capilar, espectroscopía.
Solventes Lubricantes	CG, organoléptico, espectroscopía, gravimetría, organoléptico, espectroscopía.
Biocarga	Cuenta microbiana, bioluminiscencia.
Endotoxinas	Bioensayo y LAL.

3. VALIDACIÓN DEL PROCESO DE LIMPIEZA

a) Regulación

El proceso de limpieza tiene como objetivo eliminar residuos de activo, excipientes, mezcla de ambos, detergentes o alguna otra sustancia que pueda crear un producto adulterado. De acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimiento, Productos y Servicios: Artículo 33⁴.

“Se considera adultera un producto cuando:

- I. Su naturaleza o composición no corresponda a aquellas con que se etiquete, anuncie, expendan, suministre o cuando no corresponda a las especificaciones de su autorización, o

-
- II. Haya sido objeto de tratamiento que disimule su alteración o encubra defectos en su proceso o en la calidad sanitaria de las materias primas utilizadas.”

Es por esto que la validación de los procesos de limpieza es un punto crítico en la fabricación y se justifica con base en el siguiente:

La norma oficial mexicana **NOM 059-SSA-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos**, establece en su numeral 14.1.1 “Los proveedores, las instalaciones, equipos, sistemas críticos y computacionales que impacten en la calidad del producto, deben estar calificados y los métodos analíticos, de limpieza y de producción y acondicionamiento, **deben validarse** al inicio de la operación y terminados antes de la liberación de un producto”. Así también en el numeral 14.8 establece “La validación de la limpieza debe realizarse con el fin de confirmar la efectividad de un procedimiento o método de limpieza.”, en el numeral 9.5.1.19 establece que “Los procedimientos de limpieza deben establecerse en base a los estudios de validación.”⁵

La norma oficial mexicana **NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos** establece en el numeral 20.1 que “Los procesos deben ser validados con base en protocolos que tomen en cuenta las etapas críticas de fabricación del fármaco, equipo, condiciones de operación, limpieza, instalaciones y personal.”⁶

b) Criterios de validación

La validación del proceso de limpieza asegura que los procedimientos de limpieza de equipo eliminan residuos a niveles previamente determinados como aceptables. El programa de validación de limpieza completo incluye la identificación de los elementos de limpieza, la definición del alcance de la prueba y los límites aceptables, el desarrollo del procedimiento de muestreo y prueba, así como el diseño de un proceso de validación de limpieza y un método de análisis de datos.

Los procedimientos validados deben proteger adecuadamente al producto de la contaminación cruzada principalmente presente en equipos multiusos. La estrategia involucra un plan de validación que considere el rango de productos, tipos de equipo y especificaciones concernientes a cada operación dependiendo de la compañía.

Como mínimo el programa de validación de limpieza debe contener datos como métodos apropiados de muestreo y límite máximo de residuos permisibles. Si bien no existe una forma única de definir el límite aceptable para cada uno de los residuos, comúnmente se aceptan múltiples criterios como los visuales, toxicológicos, farmacológicos y de concentración para hacer los límites aceptables sean científicamente justificables.²

Además debe establecerse una revisión periódica o auditoría a los procedimientos validados y establecer un sistema adecuado de control de cambios.²

c) Características del Protocolo de Validación de limpieza

El protocolo de validación es un documento importante debido a que es la clave para llevar a cabo el proceso de validación de limpieza. Explica cómo debe conducirse la validación y debe contener como mínimo:²

- *Identificación y presentación:* Área que elabora el documento, consecutivo del documento, año de emisión, sección de presentación de firmas y autorización, responsabilidades y objetivos.²
- *Análisis de riesgo y de variables:* Se debe desglosar cada una de las etapas críticas dentro de la operación del sistema o equipo.²
- *Instrucciones generales:* Para sistemas de limpieza automatizados deben incluir los programas de computación empleados así como el diseño y esquemas del equipo. Además, variables tales como el ciclo de tiempo, temperatura, presión, concentración y detergentes. Para los procedimientos manuales es importante incluir la documentación que soporta la capacitación personal, así mismo archivar toda la documentación recibida.²
- *Sustancias que deben ser eliminadas:* Ingredientes activos, materiales activos de descomposición, excipientes, detergentes, contaminación microbiana y endotoxinas o lubricantes.²
- *Toma de muestra:* Como se realizará y que método de toma de muestra se llevará a cabo.²
- *Pruebas analíticas utilizadas*²
- *Cuando debe ser ejecutada la validación:* Validación inicial, monitoreo de rutina, productos de reemplazo, cambios en procedimientos de limpieza, cambios en

productos, procesos y equipos, después del mantenimiento, suspensión del trabajo o contaminación, periódicamente.²

- *Parámetros físicos que pueden ser evaluados:* Como volumen de lavado y enjuague, temperatura, velocidad de flujo y presión, concentración del detergente, calidad del agua de lavado y enjuague, tiempo y secuencia.²
- *Parámetros físicos del procedimiento de limpieza que pueden ser evaluados:* Como puede ser purga de gas, evacuaciones y periodos de dren, agitación y protección del sistema.²
- *Métodos o procedimientos de prueba para asegurar la limpieza:* Estos procedimientos se emplean para generar datos que midan superficies representativas del equipo o ignorar áreas de posibles fuentes de contaminación. Deben examinarse las condiciones de limpieza actuales y las peores condiciones. Deben documentarse o hacer referencia en el protocolo.²
- *Niveles residuales permitidos:* Porcentaje de dosis terapéutica mínima (LTD). Porcentaje de dosis tóxica. Porcentaje de dosis de venta mínima y límites definidos por agencias reguladoras (disponibilidad para agentes de limpieza, excipientes, solventes, etc).²

C. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

1. GENERALIDADES

La cromatografía es un proceso de separación que se lleva a cabo por una distribución de sustancias entre una fase móvil y una estacionaria. Estas sustancias pasan por el sistema cromatográfico al ser distribuidas entre la fase móvil y la fase estacionaria. Por lo tanto el proceso cromatográfico involucra la distribución de los analitos presentes en una mezcla a separar entre dos fases inmiscibles entre sí. Una de ellas es la fase estacionaria, la cual puede ser un sólido o un líquido adsorbido o enlazado covalentemente sobre un soporte poroso de gran área superficial. La fase móvil es un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que se usa como portador de la mezcla.⁷

2. FUNDAMENTOS

Los procesos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo con el tipo de equilibrio que involucra el proceso, que a su vez está gobernado por el tipo de fase estacionaria. Los fenómenos más comunes que intervienen en la separación cromatográfica son los siguientes: adsorción, reparto, intercambio iónico, penetración en poro, afinidad y fuerza centrífuga.⁷

- **Cromatografía de adsorción.**

Adsorción es un fenómeno de superficie que no debe ser confundido con absorción, que es la penetración de una sustancia dentro del volumen de otra.

La adsorción es un fenómeno físico de superficie o interfase dependiente de fuerzas de Van der Waals débiles, fuerzas de London, y de puentes de hidrogeno, los cuales pueden involucrar enlaces electrovalentes muy fuertes. El tipo de adsorción conocido como intercambio iónico involucra interacciones eléctricas entre las especies iónicas y los sitios de carga del adsorbente, de esta manera la separación dependen del desplazamiento de iones en el medio por la muestra seguida por desorción con contraiones.⁷

La fase estacionaria es un sólido, en el que los componentes de la muestra son adsorbidos, las más comunes son sílice y alúmina. La separación ocurre a partir de una serie de pasos de adsorción/ desorción. La fase móvil y el soluto son atraídos a la superficie de la fase estacionaria. Si los solutos presentan diferentes grados de atracción a la fase estacionaria, entonces es posible llevar a cabo la separación. La fase móvil puede ser un líquido (cromatografía líquido-sólido) o un gas (cromatografía gas-

sólido). Los componentes se distribuyen en dos fases por una combinación de procesos de adsorción y desorción. La cromatografía en capa fina (CCF) es un ejemplo especial de cromatografía de adsorción en que la fase estacionaria es un plano, en la forma de un soporte sólido en una placa inerte.⁷

- **Cromatografía de reparto.**

La cromatografía de reparto puede ser llevada a cabo en hojas de papel filtro y columnas o capas finas de celulosa pulverizada. En este caso, el medio poroso actúa únicamente como un soporte para el agua, que se desempeña como un agente de reparto. La cromatografía de papel es un tipo de cromatografía de reparto en donde la fase estacionaria es una capa de agua adsorbida en una hoja de papel.⁷

La fase estacionaria de cromatografía de reparto es un líquido adsorbido o enlazado covalentemente en un sólido inerte. La separación se fundamenta en el reparto del soluto entre dos fases líquidas (solubilidad relativa). Otra vez, la fase móvil puede ser un líquido (cromatografía de partición líquido-líquido) o un gas (cromatografía líquido-gas, CLG).⁷

En el modo normal de operaciones de reparto líquido-líquido, una fase estacionaria polar (ej. Agua o metanol) es usada con una fase móvil no polar (ej. Hexano). Las sustancias más retenidas presentan una mayor afinidad (solubilidad) por la fase estacionaria, comparada con su afinidad (solubilidad) por la fase móvil. Esta retención favorecida de compuestos polares y elución de compuestos no polares es nombrada cromatografía de fase normal. Si una fase estacionaria no polar se usa con una fase móvil polar, entonces los solutos no polares son retenidos más y los solutos polares son más fácilmente eluidos. Esta se denomina cromatografía de fase reversa.⁷

- **Cromatografía de intercambio iónico**

La cromatografía de intercambio iónico puede llevarse a cabo en capa fina o en columna de adsorbentes especiales que contengan grupos intercambiadores de iones. La cromatografía de intercambio iónico utiliza como soportes sílice o resinas en donde se enlaza por reacciones específicas de polimerización el intercambiador para formar así a la fase estacionaria. Las resinas consisten en gotas pequeñas hechas de una mezcla enlazada de estireno-divinil benceno (SDB) en una forma que produce una red

insoluble, esta matriz contiene grupos químicos capaces de intercambiar cationes (grupo enlazado sulfónico) o aniones (grupo enlazado amonio cuaternario). El mecanismo de separación se basa en un equilibrio de intercambio iónico. La cromatografía de intercambio es el método de selección para el análisis de iones inorgánicos y es preferible a menudo sobre métodos de fase reversa para el análisis de este tipo de analitos. Sin embargo, este tipo de cromatografía también se emplea en la separación de macromoléculas cargadas.⁷

- **Cromatografía de exclusión molecular.**

En la cromatografía de exclusión molecular, las moléculas solvatadas son separadas de acuerdo con su tamaño, por su habilidad para penetrar una estructura tipo tamiz (la fase estacionaria). La separación en cromatografía de reparto y en cromatografía de intercambio iónico surge de diferentes interacciones de los solutos con la fase móvil y la fase estacionaria. En contraste, las separaciones en cromatografía de exclusión surgen de diferencias en tamaño molecular y la habilidad de diferentes moléculas para penetrar los poros de la fase estacionaria a diferentes grados. La cromatografía de exclusión se usa ampliamente para la separación preparativa de macromoléculas de origen biológico, además de la purificación de polímeros orgánicos y/ o sintéticos. Existen dos variantes de este tipo de cromatografía, una es llamada permeación en gel y se lleva a cabo cuando los solutos son solubles en disolventes orgánicos de mediana polaridad, en tanto la llamada filtración en gel se realiza cuando los solutos de interés son solubles en agua. La fase estacionaria es un material con tamaño de poro controlado. Se pueden obtener columnas que permitan separar determinados tamaños de molécula. De esta manera, los solutos de mayor tamaño molecular eluyen primero en tanto que los solutos de menor tamaño lo hacen posteriormente.⁷

- **Cromatografía de afinidad.**

Este tipo de cromatografía es la más selectiva y en determinados casos especifica, debido al tipo de interacciones involucradas en la separación (antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato), la fase estacionaria se conforma por biomoléculas altamente específicas enlazadas covalentemente o atrapadas físicamente en un soporte macroporoso. Por ejemplo, la molécula inmovilizada puede ser un anticuerpo o una proteína en particular. Cuando una mezcla compleja que contiene proteínas se pasa por la columna, únicamente la proteína que se acompleja con el anticuerpo es

enlazada a la fase estacionaria. Después de realizar un lavado de los otros solutos, la proteína adecuada es liberada del anticuerpo por un cambio de pH, de fuerza iónica o por el empleo de modificadores orgánicos.⁷

- **Cromatografía de fuerza centrífuga.**

Es un tipo de cromatografía líquido-líquido sin adsorbente, en la cual dos líquidos inmiscibles entre sí actúan como fase estacionaria y móvil respectivamente. El principio de la separación de un soluto involucra el reparto de éste entre la fase estacionaria inmovilizada por la fuerza centrífuga y la fase móvil que pasa a través de la estacionara por medio de un controlador de flujo. Esta técnica es muy útil para separar solutos inestables y para productos naturales. Hoy en día es llamada cromatografía de reparto centrífugo de alta eficiencia (HPCPC).⁷

3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra. La CLAR es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales termolábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. La separación cromatográfica en CLAR es resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases, móvil y estacionaria. La CLAR ofrece mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación. Todas las formas de cromatografía de líquidos son procesos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria. A continuación se resume los métodos de cromatografía líquida:

Tabla 2. Métodos comunes de la cromatografía de líquidos. ⁷

METODO	ABREVIATURA	MECANISMO PREDOMINANTE
Sólido-líquido o de adsorción	CSL	Adsorción sobre la superficie.
Líquido-líquido	CLL	Reparto entre fases líquidas, una móvil y otra estacionaria.
Fase enlazada	CFE	Reparto y/ o adsorción entre las fases móvil y enlazada.
Par iónico	CPI	Separación de pares de iones entre las fases móvil y enlazada.
Intercambio iónico	CII	Uso de la carga por adsorción sobre un sitio iónico fijo por medio de intercambio de cationes o de aniones.
Exclusión molecular	CEM	Aprovechamiento del tamaño de las moléculas por su difusión dentro de poros de tamaño adecuado.
Afinidad	CA	Uso de la estructura de ligantes inmovilizados para unir bioselectivamente a la proteína desaeada.
Reparto centrífugo	CRC	Reparto entre una fase líquida soportada por centrifugación (fase estacionaria) y otra que es impulsada por medios mecánicos (fase móvil).

a) Conceptos básicos de CLAR

La cromatografía es descrita y medida en función de cuatro conceptos principales: factor de retención, eficiencia, selectividad y resolución.

La capacidad y la selectividad de la columna son variables que se controlan en gran medida por el fabricante de columna, mientras que la eficiencia y la resolución se pueden controlar, en cierta medida, por el cromatógrafo. Para obtener la mejor separación posible, la eficiencia del sistema cromatográfico debe ser optimizado. ⁸

Para la eficacia de las separaciones de cromatografía de líquidos, una columna debe tener la capacidad para retener las muestras y los componentes de la muestra por separado, de manera eficiente. El factor de retención, k'_R , de una columna es una medida directa de la fuerza de la interacción de la muestra con el material de empaque. ⁸

El factor de retención es la medida sin unidades de la retención de un compuesto particular en un determinado sistema de cromatográfico en determinadas condiciones definido como: ⁸

$$K'_R = \frac{t_R - t_0}{t_0} = \frac{V_R - V_0}{V_0}$$

Donde V_R es el volumen de retención del analito, V_0 el volumen de la fase líquida en el sistema cromatográfico, t_R el tiempo de retención del analito, y t_0 en ocasiones se define como el tiempo de retención de los analitos no retenidos.⁸

La eficiencia es la medida del grado de dispersión de pico en una columna en particular, como tal, es esencialmente la característica de la columna, la eficiencia se expresa como el número de platos teóricos (N), calculado como:⁹

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

La selectividad es la habilidad del sistema cromatográfico para discriminar dos diferentes analitos. Es la medida de la diferencia en el tiempo de retención entre dos picos dados y describe el grado de eficacia de un sistema cromatográfico para separar dos compuestos. Esta se define como la relación de los factores de retención correspondientes:⁹

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} = \frac{V_2 - V_0}{V_1 - V_0} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

La selectividad de una columna es principalmente una función del material de empaque, aunque puede controlarse utilizando la fase móvil o la temperatura. El valor de α pueden ir desde la unidad, cuando los tiempos de retención de los dos componentes son idénticos, hasta el infinito si el primer componente de interés se eluye en el volumen vacío.⁸

Si alfa se acerca a 1, independientemente del número de platos teóricos o la longitud de tiempo que los componentes permanecen en la columna, no habrá separación.⁸

La resolución es el término usado para describir el grado de separación entre dos bandas o picos de analitos vecinos. La resolución es afectada por la selectividad, la eficiencia y el factor de retención de la columna.⁹

$$R = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} (N^{1/2}) \frac{k'}{1 + k'}$$

La siguiente figura ilustra el efecto de la selectividad, el factor de retención y la eficiencia en la resolución. Un valor de R superior a 0,8 se requiere para la cuantificación exacta de dos picos. Un valor de 1, para dos picos de igual tamaño, indica una superposición de aproximadamente el 2% de un pico sobre el otro.

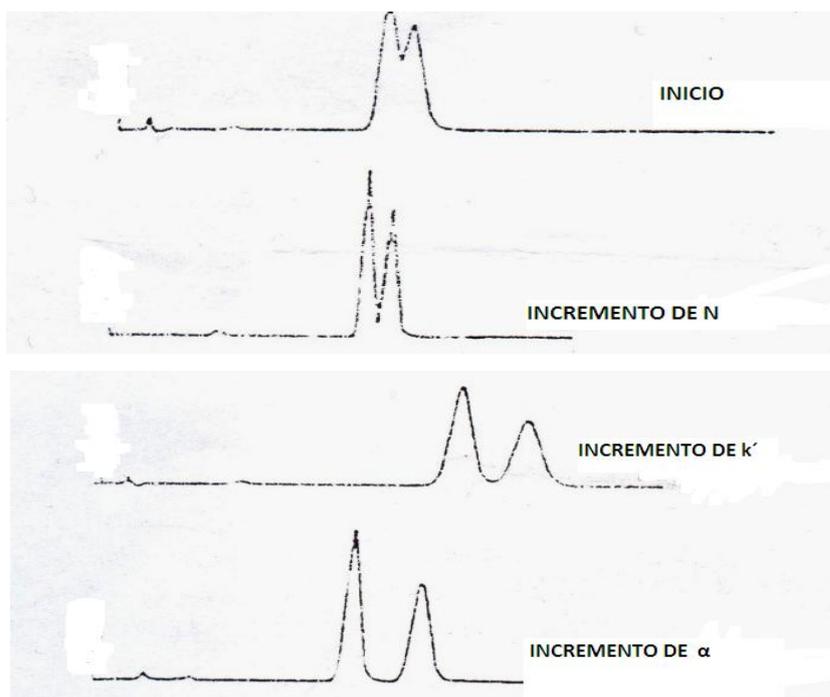


Figura 1. Efecto de la selectividad, factor de retención, eficiencia y resolución. ⁹

b) Cromatógrafo de líquidos

La instrumentación general para CLAR incorpora los siguientes componentes:

- Hay un recipiente de disolvente para la fase móvil. ⁷
- La fase móvil debe suministrarse a la columna por medio de algún tipo de bomba. Para obtener separaciones basadas tanto en tiempo de análisis corto, o bajo presión óptima, es deseable un intervalo amplio de presiones y gastos. El sistema de bombeo debe estar libre de pulsos o tener un amortiguador de pulsos para evitar generar en el detector inestabilidad de la línea base. ⁷

- Se utilizan válvulas o “loops” de muestreo para inyectar la muestra en el flujo de fase móvil justo en la cabeza de la columna de separación. Las muestras deben disolverse en una porción de la fase móvil para eliminar el innecesario pico del disolvente.⁷
- Delante de la columna de separación puede haber una precolumna o un filtro en línea para impedir la contaminación, principalmente por partículas pequeñas.⁷
- Para medir la presión de entrada a la columna se inserta un manómetro al frente de la columna de separación.⁷
- La columna de separación contiene el empaque necesario para efectuar la separación de CLAR deseada. Dicho empaque puede consistir en sílices para cromatografía de adsorción, fases enlazadas para cromatografía líquido-líquido, grupos funcionales de intercambio iónico enlazados al soporte estacionario para este tipo de cromatografía, geles de porosidad específica para cromatografía de exclusión o algún otro empaque exclusivo para un método de separación específico.⁷
- Un detector con algún tipo de dispositivo para el manejo de datos, completa la instrumentación básica.⁷

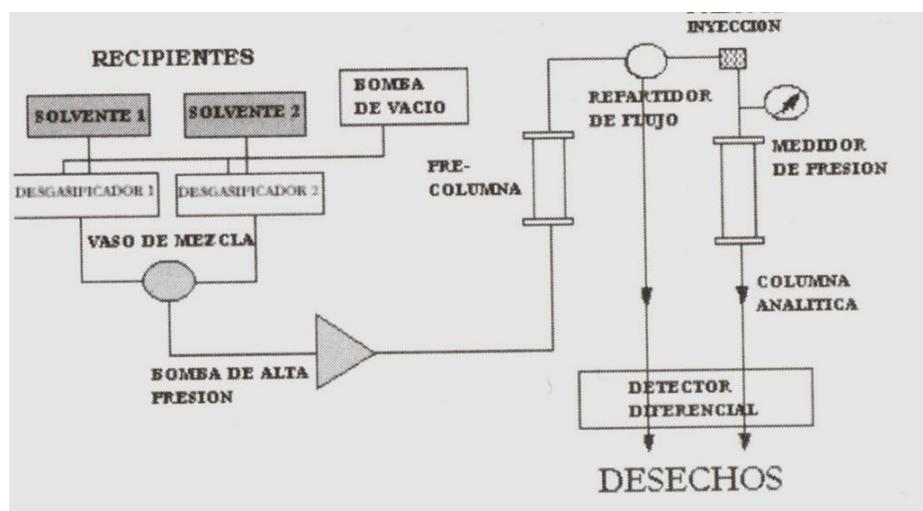


Figura 2: Componentes de un cromatógrafo de líquidos.⁷

D. MOLÉCULA DE TRABAJO

1. Estructura química.

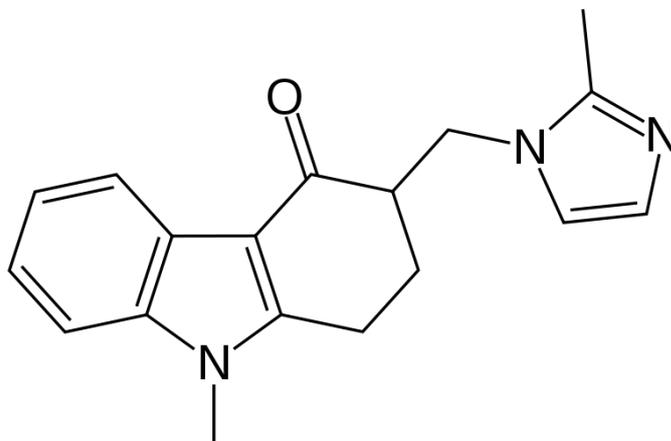


Figura 3. Estructura química del ondansetrón.

Peso molecular 365.9 g/ mol.¹⁰

2. Propiedades físicas y químicas.

El clorhidrato de ondansetrón es un polvo blanco, bastante soluble en agua sin embargo su solubilidad disminuye a pH mayores a 5.7¹¹, y etanol; soluble en metanol; poco soluble en cloruro de metileno y en isopropanol; muy poco soluble en acetona, cloroformo y acetato de etilo¹². Tiene una constante de disociación (pKa) de 7.4.¹⁰ Presenta un punto de fusión de 178.5° a 179.5°C.¹¹

3. Actividad terapéutica.

Es un antagonista selectivo de la serotonina a nivel de los receptores 5-HT₃¹², que reduce la ocurrencia y gravedad de las náuseas y los vómitos inducidos por diversos fármacos citotóxicos, y por la radioterapia. También se utiliza en la prevención y el tratamiento de las náuseas y los vómitos postoperatorios¹³.

El ondansetrón se administra por vía intramuscular o en inyección intravenosa lenta o perfusión en forma de clorhidrato, por vía oral como clorhidrato o base, o por vía rectal como base¹⁴. El rango de concentración sérica terapéutica es de 30 a 300 µg/L.¹³ Las dosis se expresan referidas a la base, 4.99 mg de clorhidrato de ondansetrón equivalen aproximadamente a 4 mg de ondansetrón base. Algunas de las dosis manejadas para adultos son las siguientes¹⁴:

- Oral. Náuseas y vómito inducidos por radioterapia, 8 mg cada 8 h; la primera dosis se debe administrar 1 a 2 h antes de la radioterapia. El tratamiento puede ser hasta por cinco días¹⁴.

- Intravenosa. Náuseas y vómito graves producidos por quimioterapia, 8 mg en inyección intravenosa lenta, o infusión 15 minutos antes de la quimioterapia. Después de 15 minutos de la quimioterapia, se repite la inyección intravenosa lenta o infusión en dosis de 8 mg, posteriormente se repite a las 4 y 8 h después de la primera.¹³

Algunas de las dosis manejadas para adultos son las siguientes:

- Intravenosa. Se recomienda el uso sólo en mayores de cuatro años a razón de 5 mg/m², 15 minutos antes de la quimioterapia, seguidos de un tratamiento por vía oral a dosis de 4 mg cada 8 h durante cinco días.¹³

4. Farmacocinética.

La concentración plasmática máxima de ondansetrón se alcanza aproximadamente 1,5 h después de la administración de una dosis oral de 8 mg, y alrededor de las 6 h después de la dosis rectal. La biodisponibilidad absoluta es de un 60 %, a causa principalmente del metabolismo de primer paso hepático. En individuos de edad avanzada, la biodisponibilidad es algo mayor (65 %) y el aclaramiento menor, probablemente por una reducción del metabolismo de primer paso hepático.¹²

El ondansetrón se distribuye ampliamente en el organismo; alrededor de un 70 a 75 % del fármaco se une a las proteínas plasmáticas. Se metaboliza en el hígado a través de múltiples vías enzimáticas. Menos de un 5 % de la dosis se excreta por orina sin modificar.¹²

La semivida de eliminación terminal es de unas 3 h después de su administración por vía oral o parenteral y de 6 h después de la administración rectal. La semivida de eliminación terminal se prolonga hasta 5 h en individuos de edad avanzada y en los que padecen insuficiencia renal.¹²

5. Efectos adversos, precauciones y toxicidad.

El ondansetrón y otros antagonistas de los receptores 5-HT₃ pueden provocar cefalea, hipo y estreñimiento. En general, los antagonistas de los receptores 5-HT₃ no deben utilizarse en pacientes que han experimentado una reacción de hipersensibilidad a un fármaco de esta clase. Deben utilizarse con precaución en pacientes con signos de

obstrucción intestinal subaguda. El ondansetrón debe administrarse a dosis más bajas en pacientes con insuficiencia hepática moderada o grave.¹²

Presenta una DL₅₀ de 95 mg/ kg por administración oral en ratas y una DL50 >45 mg/ Kg en perros por administración oral.¹⁵

E. MODELO ESTADÍSTICO

1. Ji-cuadrada

Sean X_1, X_2, \dots, X_n , variables aleatorias normales independientes, cada una con media 0 y varianza 1. La suma de sus cuadrados se representa por χ^2 (Ji-cuadrada). A la distribución correspondiente a esta suma se le llama distribución Ji-cuadra.¹⁶

$$\chi^2 = x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2$$

La distribución χ^2 desempeña un papel importante cuando se desea hacer una inferencia con respecto a la varianza σ^2 de la población basada en una muestra aleatoria X_1, X_2, \dots, X_n tomada de una población normal.¹⁶

Además del uso paramétrico de la distribución Ji-cuadrada para estimar o probar hipótesis acerca de una varianza de la población. La distribución Ji-cuadrada se utiliza como prueba de distribución libre para probar hipótesis de datos de frecuencia (pruebas de bondad de ajuste) y para probar preferencias o relación entre dos muestras independientes (pruebas de independencia).¹⁶

a) Prueba Ji-cuadrada de independencia

Otro uso de la distribución Ji-cuadrada es la prueba de hipótesis de independencia de dos criterios de clasificación, cuando se aplican a las mismas unidades elementales.¹⁶

La clasificación en dos criterios de los mismos individuos se hace en las llamadas "Tablas de contingencia o de clasificación cruzada", en la cual las filas o renglones "r" representan los niveles de un criterio de clasificación y las columnas "c" representan los niveles del otro.¹⁶

Tabla 5. Ejemplo de tabla de contingencia de 4 x 3.¹⁶

CRITERIO 1	CRITERIO 2			TOTAL
	w	x	y	
A	O ₁₁	O ₁₂	O ₁₃	r _{1.}
B	O ₂₁	O ₂₂	O ₂₃	r _{2.}
C	O ₃₁	O ₃₂	O ₃₃	r _{3.}
D	O ₄₁	O ₄₂	O ₄₃	r _{4.}
TOTAL	c _{.1}	c _{.2}	c _{.3}	N

Las frecuencias observadas se designan por O_{ij} y las esperadas por E_{ij} . El estadístico de prueba viene dado por:¹⁶

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^r \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Con $(r-1)(c-1)$ grados de libertad

$$E_{ij} = \left(\frac{r_{i\cdot}}{n} \right) \left(\frac{c_{\cdot j}}{n} \right) n = \frac{r_{i\cdot} c_{\cdot j}}{n}$$

La hipótesis nula, de que en la población los dos criterios de clasificación son independientes, si se rechaza la hipótesis nula se concluye que los dos criterios de clasificación no son independientes, sino dependientes.¹⁶

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La NOM-059-SSA1-2006 “Buenas prácticas para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos” publicada por la Secretaría de Salud, en el numeral 14.8, establece que, la validación de los procesos de limpieza debe realizarse con el fin de confirmar la efectividad de un procedimiento o método de limpieza.

El proceso de limpieza en el área de fabricación de inyectables de una empresa maquiladora de productos farmacéuticos, necesita ser actualizado y validado de acuerdo a las necesidades de fabricación de la empresa con la finalidad de confirmar su efectividad.

Ante esta situación surge la necesidad de optimizar la validación del proceso de limpieza en el área de inyectables en conformidad con la NOM-059.

Así mismo y en apego a la “Guía de Procesos de Limpieza y su Validación en áreas de Fabricación” así como la “Guía de Validación de métodos analíticos: limpieza de equipos” es necesario considerar las variables específicas para evaluar la efectividad del proceso de limpieza en el área en estudio que más impacta, tales como la evaluación del método de limpieza vigente y la selección de las zonas de muestreo empleando a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución como el método de análisis, el cual se encuentra previamente validado.

IV. OBJETIVO:

Optimizar la validación del proceso de limpieza en el área de inyectables de una empresa maquiladora de productos farmacéuticos, evaluando su efectividad por medio de un método analítico validado de CLAR.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Considerar los requisitos establecidos en la NOM-059 y los lineamientos establecidos por los CIPAM’s para el establecimiento de la validación.
- Evaluar el método de limpieza vigente, considerando las zonas de muestreo así como la ejecución de los métodos de limpieza.

V. HIPÓTESIS:

La CLAR es de utilidad para demostrar que no existe dependencia entre los diferentes puntos de muestreo de limpieza de un área estéril y el proceso de limpieza ejecutado por diferentes personas, logrando a través de esta evaluar la optimización y el cumplimiento de las especificaciones para la validación del proceso de limpieza en el área de inyectables de una empresa farmacéutica, establecidas en la NOM-059.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

El estudio es prospectivo, ya que la información obtenida se recabo en forma planeada especialmente para la investigación.

La cinética del fenómeno de estudio es longitudinal ya que se midió más de una variable dos o más veces (implicó seguimiento en el tiempo).

El estudio fue descriptivo ya que se estudió una sola población.

Para determinar si la limpieza se estaba efectuando correctamente, se evaluó si existe dependencia entre los puntos de muestreo y los grupos de personas que realizan la limpieza, realizando conteos de limpieza, es decir, la ausencia del peor caso, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Diseño estadístico. Fuente: Elaboración propia.

	Puntos de muestreo				
Personal	1	2	3	4...	14
Grupo 1	O ₁	O ₁	O ₁	O ₁	O ₁
	O...	O...	O...	O...	O...
	O ₁₀	O ₁₀	O ₁₀	O ₁₀	O ₁₀
Grupo 2	O ₁	O ₁	O ₁	O ₁	O ₁
	O...	O...	O...	O...	O...
	O ₁₀	O ₁	O ₁₀	O ₁₀	O ₁₀
Grupo 3	O ₁	O ₁	O ₁	O ₁	O ₁
	O...	O...	O...	O...	O...
	O ₁₀	O ₁₀	O ₁₀	O ₁₀	O ₁₀

Ho: No existe dependencia entre el personal que realiza la limpieza y el punto que se muestrea.

Ha: Existe dependencia entre el personal que realiza la limpieza y el punto que se muestrea.

Para realizar la evaluación antes mencionada en la tabla 5 se utilizó la prueba de independencia Ji-Cuadrada como modelo estadístico, el cual utiliza el siguiente estadígrafo de prueba:

$$\chi^2 = \sum_{j=1}^c \sum_{i=1}^r \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Con $r-1)(c-1)$ grados de libertad

POBLACIÓN

Área de inyectables.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras tomadas del área de inyectables después de la limpieza de la misma al término de la fabricación del peor caso por el personal de limpieza.

CRITERIOS DE EXCLUSION

Muestras tomadas del área de inyectables después de la fabricación del peor caso, sin haber efectuado antes de la toma de muestra la limpieza de la misma por el personal de limpieza.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Muestras tomadas del área de inyectables después de la limpieza de la fabricación del peor caso que no se encuentre perfectamente identificadas con respecto al punto de muestreo, lote fabricado y/ o grupo que efectúa la limpieza, o que el personal que haya efectuado la limpieza no se encuentre calificado.

CRITERIOS DE VARIABLE

Personal. El personal realizó la limpieza al final de la fabricación y llenado del “peor caso”, esto por tres lotes consecutivos. La limpieza fue efectuada por un grupo de personas.

Puntos de muestreo. Los puntos de muestreo a analizar fueron los siguientes (ver figura 4):

- | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1. Tanque de fabricación. | 7. Vestíbulo. |
| 2. Área de Fabricación de inyectables. | 8. Esclusa de ingreso al área aséptica. |
| 3. Esclusa de Fabricación. | 9. Entrada y salida de materiales. |
| 4. Área de Llenado 2. | 10. Desvestidor. |
| 5. Máquina Llenadora. | 11. Vestidor. |
| 6. Área de Liofilizado. | 7. Vestíbulo. |

Se determinaron estos puntos ya que son los que tienen contacto directo y cercano con el producto durante la fabricación y son puntos en los cuales, si no hay una limpieza adecuada, pueden generar contaminación.

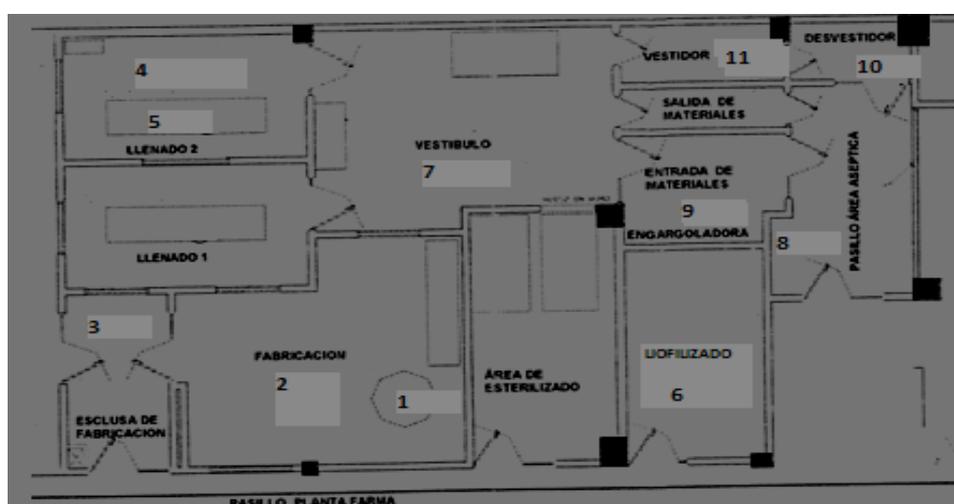


Figura 4. Puntos muestreados del área de Inyectables.

VI. METODOLOGÍA

1. Se realizó una investigación de la solubilidad y las dosis letales (DL_{50}), los cuales fueron reportados en el “Protocolo general de validación de limpieza”, código del documento V-CAL- 389, de los productos que se fabrican en el área de inyectables, y con base en la DL_{50} menor se estableció el “peor caso”.
2. Se procedió a la elaboración del protocolo de validación de limpieza para el área de inyectables ó área aséptica, el cual lleva como nombre, “Protocolo para la validación de limpieza para la planta Farma, área aséptica”.
3. Se realizó la capacitación del personal de limpieza y el personal de toma de muestra. Se realizó la evaluación del personal de limpieza a través de tres tipos de exámenes uno escrito, una entrevista y una inspección visual. El personal de toma de muestra fue evaluado a través del por ciento de recobro.
4. Se realizó la toma de muestra de cada uno de los puntos mencionados anteriormente después de la limpieza efectuada al término de la fabricación y llenado del peor caso, en tres lotes consecutivos del mismo. Ver figura 4.
5. Las muestras fueron analizadas por HPLC con un método previamente validado. Los datos fueron procesados y se obtuvieron los resultados para cada lote del peor caso.
6. Se realizó la prueba de ji cuadrada a los resultados obtenidos.
7. Los resultados obtenidos en la prueba ji cuadrada fueron analizados para obtener una conclusión.

VII. RESULTADOS

Establecimiento del peor caso

A continuación se muestra la matriz para la determinación del peor caso.

Tabla 6. Matriz para la determinación del peor caso.¹⁶

Principio activo	Solubilidad	LD50
Ciprofloxacino clorhidrato	Soluble en agua; ligeramente soluble en metanol; muy ligeramente soluble en etanol; casi insoluble en acetona, acetato de etilo y cloruro de metileno	5 g/Kg
Dobutamina Clorhidrato	Soluble en metanol; poco soluble en agua y alcohol; casi insoluble en éter dietílico	2296 mg/Kg
Levofloxacino	Soluble en agua caliente.	1803 mg/kg
Maleato de ergometrina	Poco soluble en agua; ligeramente soluble en alcohol; casi insoluble en cloroformo y en éter dietílico	93 mg/kg
Nimodipino	Fácilmente soluble en acetona; poco soluble en etanol; casi insoluble en agua.	2738 mg/kg
Ondansetrón clorhidrato	Poco soluble en agua y alcohol, soluble en metanol; ligeramente soluble en isopropanol y diclorometano; Muy ligeramente soluble en acetona, en cloroformo y en acetato de etilo.	95 mg/Kg
Cloruro de Acetilcolina	Muy soluble en agua; libremente soluble en alcohol; Insoluble en éter, Se descompone por agua caliente y bases.	2500 mg/Kg

Protocolo de validación.

Una vez identificado al ondansetrón como el peor caso se procedió a realizar el protocolo de validación de limpieza de acuerdo a los criterios internos establecidos.

	CODIGO: V-CAL-424	TIPO DEL DOCUMENTO: Protocolo de Validación Analítica	FECHA DE EMISIÓN: 17-Noviembre-2010	
	EDICION: 1ª	DEPARTAMENTO EMISOR: Aseguramiento y Control de Calidad	SUSTITUYE A: Nueva	
NOMBRE DEL DOCUMENTO Protocolo para la validación de limpieza para la planta Farma, área aséptica.	FECHA SIGUIENTE REVISIÓN: 17-Noviembre-2013	VIGENCIA: 3 años	PÁGINA: 1 de 9	
	VIGENTE A PARTIR DEL: 01-Diciembre-2010	PÁGINA CON ANEXOS: 1 de 14		

ELABORO	PUESTO	FIRMA	FECHA
Q.F.B. Valeria Arany Olvera Gómez	Químico Analista	V. Olvera	17-NOV-10

REVISO	PUESTO	FIRMA	FECHA
Q.F.B. Lucia Pérez Islas	Químico en Validación Analítica	L. Pérez	18-NOV-10

AUTORIZO	PUESTO	FIRMA	FECHA
Q.F.B. Marciana Estrada González	Responsable Sanitario/ Gerente de Aseguramiento y Control de Calidad	M. Estrada	19-NOV-10

Figura 5. Portada del protocolo de validación elaborado.

Calificación del personal.

Se procedió a realizar la calificación del personal de limpieza de acuerdo a los criterios internos establecidos. Los cuales constan de tres exámenes (escrito, oral y una inspección visual).

Con respecto al personal de inspección la calificación se realizó a través de los porcentos de recobro. A continuación se muestran los resultados obtenidos de los porcentos de recobre para cada inspector.

	CODIGO DEL DOCUMENTO: V-CAL-428	TIPO Y NOMBRE DEL DOCUMENTO : Reporte de Validación Reporte de la determinación del % de recobro de Clorhidrato de Ondansetron	FORMATO: 2
			PÁGINA: 1 de 1

POR CIENTO DE RECOBRO					
<ul style="list-style-type: none"> FECHA DE ANÁLISIS: 05-ENE-11 al 07-ENE-11 ANALISTA: QFB. V. Olvera INSPECTOR 1: TEC A. Amador INSPECTOR 2: QFB. A. Rodríguez INSPECTOR 3: TEC. M. Molina 					
DIA		ANALISTA	INSPECTORES		
			1	2	3
% DE RECOBRO					
DIA	1	98.09	98.69	98.53	98.91
		98.07	98.12	99.23	98.34
		100.04	98.37	99.56	98.84
	2	98.01	98.76	98.97	99.83
		98.31	99.25	99.67	99.12
		98.79	98.77	99.28	98.36
	3	99.01	100.94	99.65	100.63
		98.47	101.40	101.46	101.00
		98.81	98.92	101.46	98.31
PROMEDIO		98.62	99.25	99.76	99.26
DESVEST		0.64	1.14	1.03	1.01
%CV		0.65	1.15	1.03	1.01

FECHA DE TÉRMINO DE ANALISIS: 07-ENE-11

REALIZO: L. Pérez V. Olvera
Firma/Fecha

VERIFICO: C. López 11-Ene-11
Firma/Fecha

Figura 6. Hoja de resultados del reporte del por ciento de recobro de cada inspector.

Reportes analíticos de las trazas de ondansetrón.

Se anexan a continuación la muestra de los reportes analíticos de las trazas de ondansetrón del primer lote de validación:

Empower 2 SOFTWARE

Trazas de Ondansetron STD

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Estandar	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	25 FEB 11 VALIDACION LIMPIEZA
Vial:	2	Acq. Method Set:	Trazas de Ondansetron
Injection #:	1	Processing Method:	TRAZAS ONDANSETRON
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	6.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 216nm
Date Acquired:	2/25/2011 12:24:36 PM CST, 2/26/2011 1:03:15 AM CST		
Date Processed:	3/3/2011 12:43:46 PM CST		

Analista: L. Perez / V. Olvera
 Reporte de Trazas de Clorhidrato de Ondansetron
 Numero de Analisis: PG 111-11, PG-115-11, PG 116-11, PG 118-11 al PG 123-11.
 Columna: Varian MbonoChrom 5 CN, 250 X 4.60 mm
 Lote de Ondansetron fabricado previo a la limpieza: LPT111B003

DATOS DEL ESTANDAR
 No. lote: LMP09G026 Purity: 101.2 %
 Peso: 10.5 mg Caducidad: May-11

SampleName	Sample Type	Vial	Inj #	Run Time (Minutes)	Injection Volume (ul)	Acquisition Method Set	Sample Weight	Processed Channel Descr.	Dilution
1 Estandar	Standard	2	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm	1.00000
2 Estandar	Standard	2	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm	1.00000

Peak Name	RT	Area	% Area	Platos teoricos	Factor de coleo	Dilution	mg/mL
1 Clorhidrato de Ondansetron	3.540	671621	100.00			1.00	
2 Clorhidrato de Ondansetron	3.549	675446	100.00			1.00	
Mean	3.54	673533.06	100.00				
Std. Dev.	0.01	2704.67	0.00				
% RSD	0.2	0.4	0.0				

Reported by User: System Project Name: TRAZAS DE ONDANSETRON
 Report Method: Trazas de Ondansetron STD Date Printed: 3/15/2011
 Report Method ID: 3916 Page: 1 of 2 1:09:30 PM America/Mexico_City

Figura 7. Portada del reporte de trazas para el estándar, primer lote de validación.

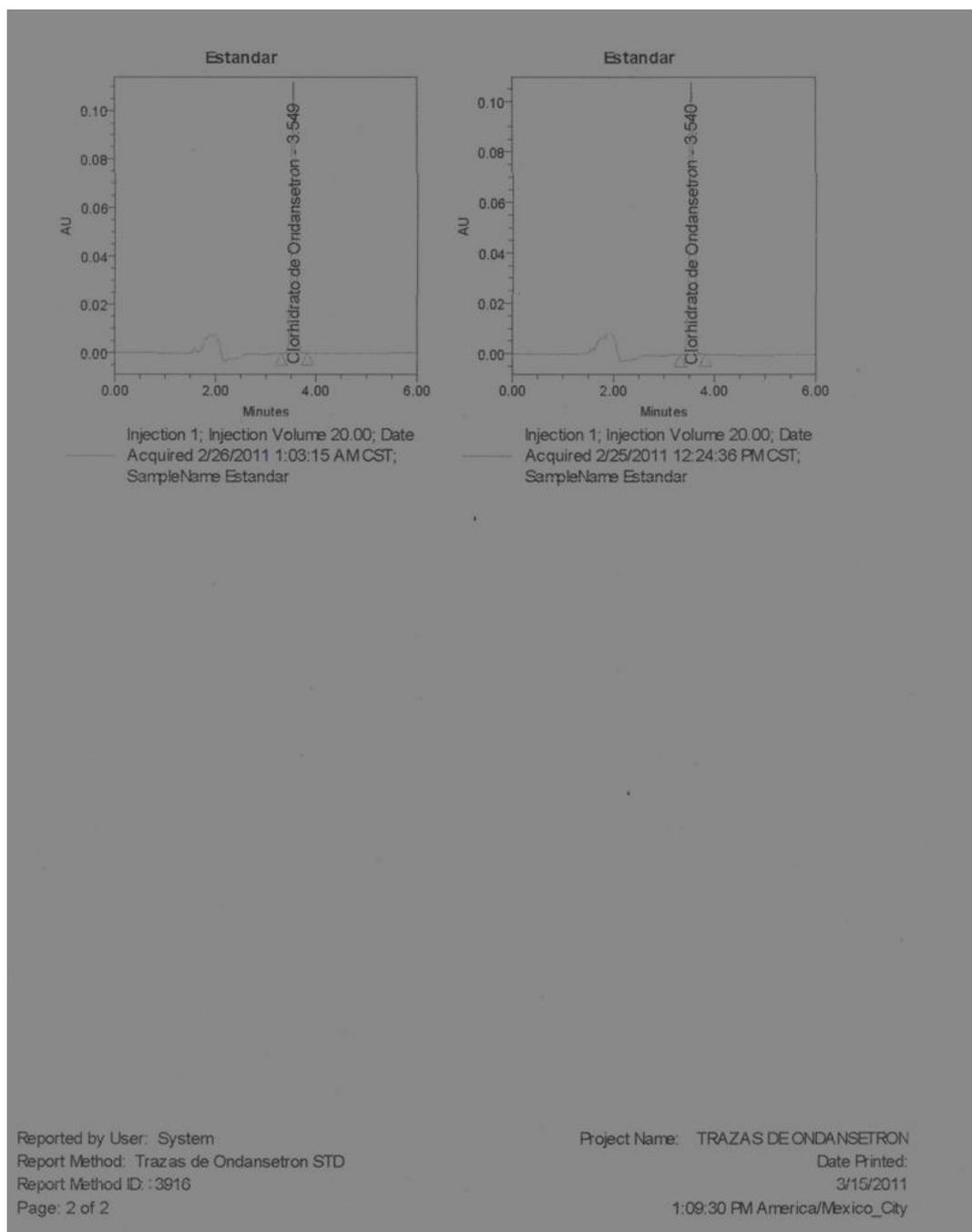


Figura 8. Muestra de cromatogramas del estándar en el reporte de trazas, primer lote de validación.

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	2-B Exterior del tanque M2, 5-B	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	25 FEB 11 VALIDACION LIMPIEZA
Vial:	1, 26, 45, 47, 55, 58, 61, 73, 86, 99,	Acq. Method Set:	Trazas de Ondansetron
Injection #:	1	Processing Method:	TRAZAS ONDANSETRON
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	W2489 ChA
Run Time:	6.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	W2489 ChA 216nm
Date Acquired:	2/25/2011 12:17:51 PM CST, 2/25/2011 12:31:20 PM CST, 2/25/2011 12:38:06 PM CST,		
Date Processed:	3/3/2011 12:52:27 PM CST, 3/3/2011 12:52:28 PM CST, 3/3/2011 12:52:29 PM CST, 3/3/2011		

Analista: L. Perez / V. Olvera
 Reporte de Trazas de Clorhidrato de Ondansetron, area aseptica
 No. Analisis: PG 111-11, PG 115-11, PG 116-1, PG 118-11 al PG 123-11.
 Columna: Varian MonoChrom 5 CN, 250 x 4.6 mm
 Lote de Ondansetron fabricado previo a la limpieza: LPT111B003

	SampleName	Sample Type	Vial	Inj #	Run Time (Minutes)	Injection Volume (ul)	Acquisition Method Set	Sample Weight	Processed Channel Descr.
1	Solvente de dilucion	Unknown	1	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
2	1-B Solv ente dilucion+hisopo M1	Unknown	3	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
3	1-B Solv ente dilucion+hisopo M2	Unknown	4	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
4	2-B Exterior del tanque M1	Unknown	5	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
5	2-B Exterior del tanque M2	Unknown	6	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
6	3-B Interior del tanque M1	Unknown	7	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
7	3-B Interior del tanque M2	Unknown	8	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetroq	1.00000	W2489 ChA 216nm
8	4-B Valv ula del tanque M1	Unknown	9	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
9	4-B Valv ula del tanque M2	Unknown	10	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
10	5-B Aspas /o propela M1	Unknown	11	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
11	5-B Aspas /o propela M2	Unknown	12	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
12	6-B Solv ente dilucion+hisopo M1	Unknown	13	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
13	6-B Solv ente dilucion+hisopo M2	Unknown	14	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
14	7-B Mesa fabricacion M1	Unknown	15	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
15	7-B Mesa fabricacion M2	Unknown	16	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
16	8-B Piso entrada fabricacion M1	Unknown	17	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
17	8-B Piso entrada fabricacion M2	Unknown	18	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
18	9-B Pared de fabricacion M1	Unknown	19	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
19	9-B Pared de fabricacion M2	Unknown	20	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm
20	10-B Puerta ingreso esclusa M1	Unknown	21	1	6.00	20.00	Trazas de Ondansetron	1.00000	W2489 ChA 216nm

Reported by User: System
 Report Method: Trazas de Ondansetron Mta
 Report Method ID: 4081
 Page: 1 of 34

Project Name: TRAZAS DE ONDANSETRON
 Date Printed: 3/15/2011
 1:17:07 PM America/Mexico_City

Figura 9. Portada del reporte de trazas para las muestras, primer lote de validación.

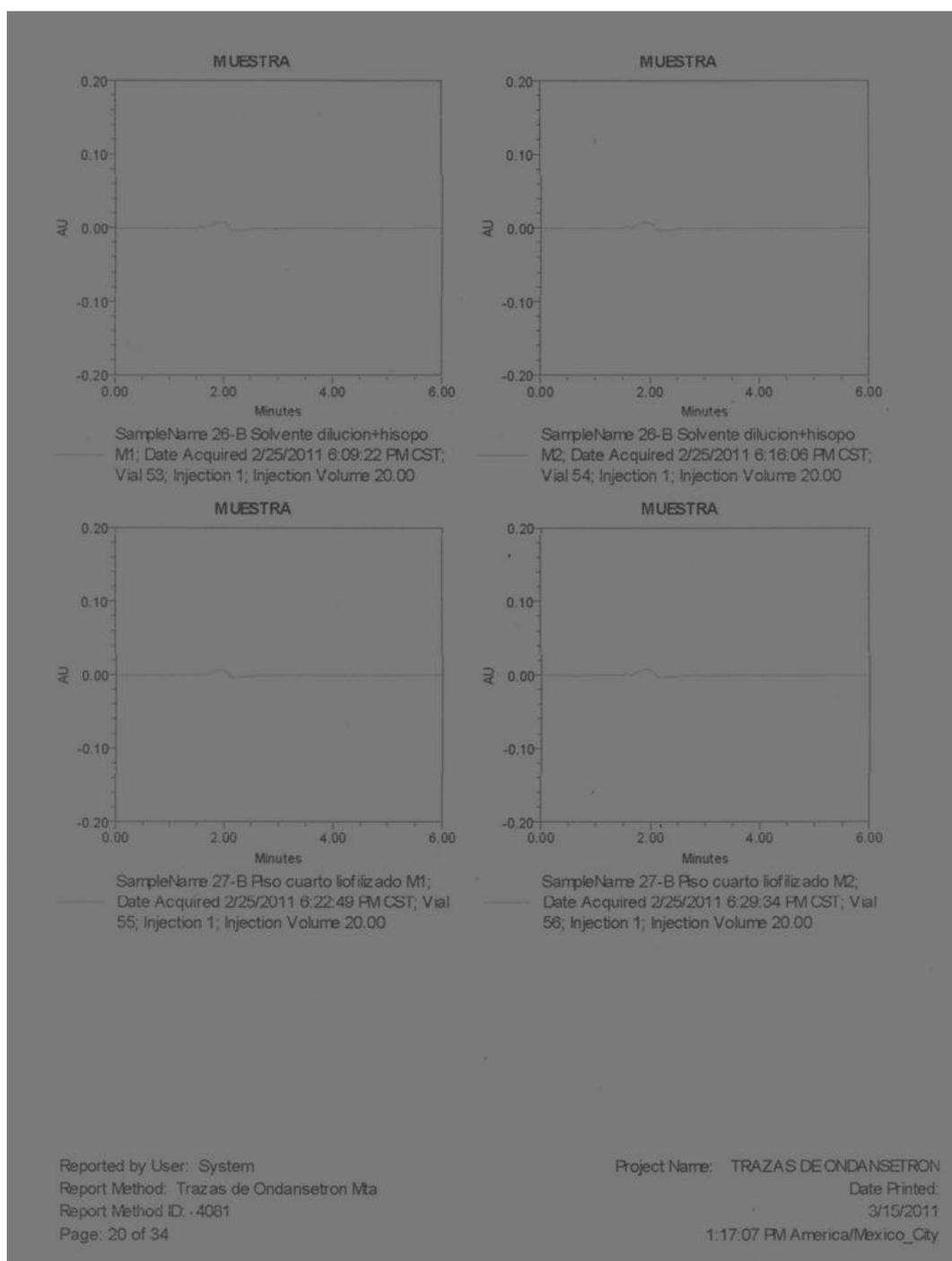


Figura 10. Muestra de cromatogramas del punto de liofilizado en el reporte de trazas, primer lote de validación.

A continuación se muestra un resumen de los resultados obtenidos en los cromatogramas para los tres lotes de validación, tanto los estándares como las muestras:

Tabla 7. Datos del estándar en los tres lotes de validación.

Lote de validación	Área del estándar	Tiempo de retención del estándar.
LPTI11B003	673533.06	3.54
LPTI11B004	678506.19	3.57
LPTI11B005	892602.89	3.49

Tabla 8. Datos de las muestras en los tres lotes de validación para cada punto de muestreo, con respecto a la presencia del “peor caso”.

PUNTO DE MUESTREO	LPTI11B003	LPTI11B004	LPTI11B005
Tanque de fabricación.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Área de fabricación de inyectables.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Esclusa de fabricación.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Área de llenado 2.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Maquina llenadora.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Área de liofilizado.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Vestíbulo.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Esclusa de ingreso al área aséptica.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Entrada y salida de materiales.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Desvestidor.	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Vestidor.	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Evaluación estadística de los resultados

Tabla 9. Frecuencias observadas para la validación del proceso de limpieza.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	TOTAL
GRUPO 1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	88
GRUPO 2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	88
GRUPO 3	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	88
TOTAL	24	264										

Puntos de muestreo: A. Tanque de fabricación. B. Área de Fabricación de inyectables. C. Esclusa de Fabricación. D. Área de llenado
2. E. Maquina llenadora. F. Área de Liofilizado. G. Vestíbulo. H. Esclusa de ingreso al área aséptica. I. Entrada y salida de materiales.
Desvestidor. K. Vestidor.

Tabla 10. Valores obtenidos de la prueba de independencia.

Grados de libertad	Valor de α	Valor teórico de χ^2	Valor real del estadígrafo de prueba (χ^2)
33	0.1	43.7452	0

Ho: No existe dependencia entre el personal que realiza la limpieza y el punto que se muestrea.

Ha: Existe dependencia entre el personal que realiza la limpieza y el punto que se muestrea.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se puede observar en la tabla 6 de todos los productos fabricados en el área, se eligió como peor caso al ondansetrón, cuya molécula posee propiedades toxicológicas de LD₅₀ bajas, así como su poca solubilidad en agua, considerando además que es el producto que se fabrica con mayor frecuencia en el área de inyectables y así también debido a su presentación es el producto que comparte la máquina de llenado con la mayoría de los productos que se fabrican en el área a excepción del producto que contiene maleato de ergometrina, el cual se llena en otra máquina que es de uso exclusivo del mismo.

El límite y criterio de aceptación para el peor caso de acuerdo a lo establecido en el protocolo interno, es de menos de 10 ppm/625 cm² esto es que no se permite más de 0.016 ppm/ cm².¹⁶ El método analítico utilizado en la validación del proceso de limpieza presenta un límite de detección de 6 ppm.¹⁷ Cumpliendo de esta forma con lo establecido en la NOM-059-SSA1-2006 con respecto a utilizar métodos analíticos validados cuyo límite de detección sea lo suficientemente sensible para detectar y cuantificar el nivel aceptable establecido del residuo o contaminante.

Una vez identificado al ondansetrón como el peor caso se procedió a realizar el protocolo de validación de limpieza para el área de inyectables, el cual lleva como nombre "Protocolo para la validación de limpieza para la planta Farma, área aséptica.", ver figura 4, en cual se incluye la determinación del peor caso, los límites y criterios de aceptación para el ondansetrón, el plan de muestreo, la calificación del personal de limpieza, el proceso de limpieza y su evaluación, así como la toma de la muestra.

De acuerdo a lo establecido en el protocolo correspondiente se realizó la calificación del personal de limpieza a través de los 3 exámenes anexados en el mismo. Dicha calificación consistió de un examen escrito de opción múltiple el cual tuvo como finalidad evaluar si el personal poseía los conocimientos básicos para poder realizar la limpieza en el área proporcionados a través de la lectura de los procedimientos que corresponden a la limpieza del área; una entrevista (o examen oral) la cual evaluó si el personal comprende dichos conocimientos y finalmente una inspección visual con la cual se evaluó si el personal llevaba correctamente a la práctica los conocimientos

adquiridos. Todo el personal que entro al área de inyectables para realizar la limpieza estaba calificado como se mencionó anteriormente.

El personal de inspección también fue calificado a través de la evaluación del porcentaje de recobro, en la figura 6 se pueden observar los resultados obtenidos de dicha evaluación, en la cual se puede observar que todos los inspectores evaluados poseen un porcentaje de recuperación mayor al 98 % del activo, por lo que todos los inspectores están calificados para la toma de muestra, cabe resaltar que la toma de muestra en los tres lotes de validación fue realizada por el inspector 2, el cual presenta el mayor porcentaje de recuperación, ya que fue el inspector asignado para dicha área al momento de realizar la validación de la limpieza, por lo cual no existe interferencia por parte del personal que realiza la toma de muestra.

Después de la fabricación y llenado de ondansetrón, se llevo a cabo el proceso de limpieza por grupos de experiencia homogénea de dos personas diferentes por lote de fabricación, al finalizar el proceso se realizo la inspección visual antes de la toma de muestra del área, la cual consiste en observar el área para asegurar que no existen residuos visibles que puedan invalidar el proceso de limpieza, posterior a esto se realizo la toma de muestra, y la evaluación analítica de cada uno de los puntos muestreados por HPLC, utilizando el método analítico validado mencionado anteriormente.

Las portada del reporte analítico de el primer lote de validación, así como una muestra de los cromatogramas obtenidos de algunos puntos de muestreo pueden observarse de la figura 7 a la figura 10. En las muestras de los cromatogramas antes mencionadas se puede observar no hubo presencia del peor caso para los puntos de muestra. En la tabla 8 se hace un resumen de los reportes analíticos de los tres lotes de validación observando que en ningún punto de muestreo se detecto la presencia del peor caso.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los reportes analíticos, para cada punto de muestreo se realizó la contabilización de las ausencias del peor caso para cada lote de validación obteniendo la tabla 9 que muestra las frecuencias observadas durante el análisis.

Con estos resultados se llevó a cabo la prueba de independencia χ^2 , los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 10, obteniendo un χ^2 de 0.

Una χ^2 de 0 indica que no existe diferencia entre las frecuencias observadas y las frecuencias esperadas, lo cual demuestra que no existe dependencia entre las variables de estudio, no importa el punto que se muestre o quien realice la limpieza el resultado será la ausencia o disminución de los residuos generados en la fabricación o llenado del ondansetrón (peor caso) y así también con los demás productos que se fabriquen en el área.

Con todo lo anterior se demuestra que la CLAR es un método analítico sensible y de utilidad para demostrar que no existe dependencia entre los diferentes puntos de muestreo de limpieza de un área de inyectables y el proceso de limpieza ejecutado por diferentes personas.

IX. CONCLUSIONES

A través de la determinación del ondansetrón como el peor caso en el proceso de limpieza, así como la evaluación del personal que realizó dicho proceso, se logró optimizar la validación del mismo.

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda establecer un programa de monitoreo anual que relacione la cantidad de lotes a fabricar del producto que contiene ondansetrón con el plan de muestreo anual para realizar el monitoreo del peor caso que permita mantener el estado validado.

Así como validar el proceso de limpieza para la maquina utilizada exclusivamente para el llenado del producto que contiene maleato de ergometrina a pesar de que dicha maquina solo se utilice para el llenado de un solo producto.

En caso de que, por las mismas características de la empresa como maquiladora, llegara un nuevo producto a fabricar en el área de inyectables, se debe anexar a la matriz de determinación del peor caso y en caso de que este, tuviera una solubilidad y una DL_{50} menor a la del peor caso, se debe volver a validar el proceso de limpieza con este nuevo producto. Todo personal de limpieza de nuevo ingreso debe capacitarse y calificarse, antes de poder ingresar a realizar la limpieza del área.

XI. REFERENCIAS

1. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación. Buenas Prácticas de Validación. Monografía técnica 24. México, 2006. pp 19-25, 80-87.
2. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación. Procesos de limpieza y su validación en áreas de fabricación. Monografía técnica 16. México, 1999. pp 14-17, 23-27, 34-37.
3. Comisión Interinstitucional de Buenas Prácticas de Fabricación. Guía de validación de métodos analíticos: limpieza de equipos. Monografía técnica 22. México, 2004. pp 20-22, 25-29, 50-54.
4. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. Diario Oficial de la Federación 18 de Enero 1988. p 8.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2006, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. México: Diario Oficial de la federación 6 de Octubre 2005. pp 22, 30.
6. Norma Oficial Mexicana NOM-164-SSA1-1998, Buenas prácticas de fabricación para fármacos. México: Diario Oficial de la federación 15 Noviembre 2000. p 28.
7. Hernández A. V.J, Vázquez L. J. C., Mendoza M. M. T.,et al. Introducción a las técnicas cromatográficas instrumentales más utilizadas en el Análisis Farmacéutico. México: FES-Zaragoza UNAM, 2008.pp 6-9, 44-46.
8. Brown R. P, Weston A. HPLC and CE Principles and practice.USA: Academic Press, 1997.pp 7-11.
9. Ahuja S., Rasmussen H. HPLC METHOD DEVELOPMENT. Volumen 8. Italia: Elsevier, 2007.pp 13-16.

-
10. O'Neil J. M. The Merck Index. 14^a edición. USA: Merck & Co. INC, 2006. pp 1180.
 11. Galichet Y. L. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. 3^a edición. Gran Bretaña: Pharmaceutical Press, 2004. pp 1368, 1369.
 12. Sweetman S. C. Martindale: Guía completa de consulta farmacoterapéutica. 3^a edición. Gran Bretaña: Pharma Editores, 2008. pp 1681-1684.
 13. Rodríguez C. R. Vademécum Académico de medicamentos. 4^a edición. México: Mc Graw Hill, 2005. pp 622, 624.
 14. U.S. Pharmacopeia Material Safety Data Sheet: Ondansetrón Hydrochloride [internet], The United States Pharmacopeial Convention 2011 [Citado: 23 de Marzo 2011, 21:32]. Disponible en:
"http://store.usp.org/OA_HTML/ibeCCtPltmDspRte.jsp?item=18181§ion=10562&beginIndex=20&siteX=10020:22372:US"
 15. Sánchez R J. Introducción al análisis de datos en Farmacia y Química Clínica. 2^a edición. México: FES-Zaragoza UNAM, 1997. pp 148, 303, 322-324.
 16. Protocolo general para la validación de la limpieza, V-CAL -389, Bonaplast S.A. de C.V., 2010.
 17. Reporte de la validación del método analítico para trazas de Clorhidrato de Ondansetrón, V-CAL-427, Bonaplast S.A. de C.V., 2010.
 18. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Métodos Analíticos, guía de validación. México: 2002. pp. 08-19.
 19. McLaughlin Malcom C. The Aqueous Cleaning Handbook: A guide to critical-cleaning procedures, techniques, and validation. 4^a edición. USA: Technical Communications, 2005. Pp 105-119.

-
20. WHO Technical Report Series No. 937. Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. USA: World Health Organization. 2006. pp 107-119, 127-135.

 21. PDA Technical Report No. 29. Points to Consider for Cleaning Validation. USA: DRAFT. 1998.